

**Michał Kozłowski**

**Synteza i charakterystyka kompleksów  
lantanowców i ich zastosowanie jako  
syntetyczne rybonukleazy**

Praca przedstawiona Radzie Wydziału  
Chemii Uniwersytetu im. Adama  
Mickiewicza w Poznaniu w celu uzyskania  
stopnia doktora nauk chemicznych

Promotor: prof. dr hab. Wanda Radecka-Paryzek

**POZNAŃ, 2012**

# Synthesis and characterization of lanthanide complexes and their application as synthetic ribonucleases

Lanthanide ion complexes attract considerable attention in last decades since that can be used in biotechnology, bioengineering, medicine. Catalytic activity of complexes containing lanthanide ions for hydrolysis of nucleic acids is of particular interest.

In these thesis, new lanthanide complexes containing hydrazone and salen type ligand: *N,N'*-bis(salicylidene)-1,12-diamine-4,9-dioxadodecane, *N,N'*-bis(salicylidene)-1,5-diamine-2-methylpentane, 2,6-diacetylpyridine-bis(2-aminobenzoilhydrazone) or 2,6-diacetylpyridine-(2-aminobenzoilhydrazone) were synthesized. All complexes were characterized by analytical and spectral methods. Compounds isolated in the form of crystals were identified by X-ray crystal structure determination.

Complexes were used to hydrolyze phosphodiester bond in RNA. The results reveal that some lanthanide complexes can selectively hydrolyse RNA at the target site. These specific properties seem to be of interest for treatment of genetic diseases investigation.

Ribonuclease synthetic precursor (2'OMe RNA containing oxygen donor atom ligand on 5' end) was synthesized. Specific properties of this precursor complexed with lanthanide ions for the hydrolysis of phosphodiester bond in RNA were studied.

*Mojemu promotorowi,  
Pani prof. dr hab. Wandzie Radeckiej-Paryzek  
za wskazanie interesującego tematu  
i pomoc w trakcie wykonywania pracy  
składam serdeczne podziękowania*

*Panu  
prof. dr hab. Ryszardowi Kierzkowi  
za wszechstronną pomoc  
i stworzenie warunków do pracy  
składam serdeczne podziękowania*

*Panu  
prof. dr hab. Maciejowi Kubickiemu  
za pomiary dyfrakcyjne  
serdeczne dziękuję*

# SPIS TREŚCI

<b>I. WSTĘP I CEL PRACY</b>	<b>1</b>
<b>II. SKRÓTY STOSOWANE W PRACY</b>	<b>3</b>
<b>III. CZĘŚĆ LITERATUROWA</b>	<b>5</b>
<b>1. Związki kompleksowe lantanowców zawierające salenowe i hydrazonowe ligandy typu zasad Schiffa</b>	<b>5</b>
1.1 Przykłady kompleksów lantanowców zawierających ligandy salenowe	6
1.2 Przykłady kompleksów lantanowców zawierających ligandy hydrazonowe	22
<b>2. Syntetyczne rybonukleazy</b>	<b>30</b>
2.1 Informacje wstępne	30
2.2 Metody hydrolizy	31
2.3 Znaczenie miejsca przyłączenia kompleksu lantanowca(III) do łańcucha DNA	32
2.4 Mechanizm hydrolizy RNA	34
2.5 Hydroliza RNA	36
2.5.1 Jony lantanowców(III) i ich kompleksy	36
2.5.2. Kompleksy lantanowców(III) przyłączone do DNA	41
2.6 PODSUMOWANIE	44
<b>IV. CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA</b>	<b>46</b>
<b>1. Metody charakterystyki ligandów i związków kompleksowych</b>	<b>46</b>
<b>2. Metody charakterystyki prekursorów syntetycznych rybonukleaz oraz oligonukleotydów</b>	<b>47</b>
<b>3. Synteza związków kompleksowych lantanowców</b>	<b>48</b>
3.1 Synteza związków kompleksowych lantanowców(III) zawierających <i>N,N'</i> -bis(salicylideno)-1,12-diamino-4,9-dioksadodekan – ligand $H_2L^1$	49
3.2 Synteza związków kompleksowych lantanowców(III) zawierających <i>N,N'</i> -bis(salicylideno)-1,5-diamino-2-metylopentan – ligand $H_2L^2$	53
3.3 Synteza związków kompleksowych lantanowców(III) zawierających 2,6-diacetylopirydyno-bis(2-aminobenzoilohydrazon) – ligand $L^3$ i 2,6-diacetylopirydyno-(2-aminobenzoilohydrazon) – ligand $L^4$	55
3.3.1 Metoda templatowa	55
3.3.2 Metoda bezpośrednia	56
3.3.2.1 Synteza ligandów	57
3.3.2.2 Synteza związków kompleksowych	58
<b>4. Syntezy związane z syntetycznymi rybonukleazami</b>	<b>59</b>
<b>4.1 Synteza, odblokowanie i oczyszczanie nukleotydów i oligonukleotydów RNA i 2'OMe RNA</b>	<b>59</b>
4.1.1 Synteza RNA i 2'OMe RNA	59
4.1.2 Odblokowanie i odcięcie od podłoża stałego CPG	59
4.1.2.1 Odblokowanie i odcięcie od podłoża stałego CPG 2'OMe RNA	59
4.1.2.2 Odblokowanie i odcięcie od podłoża stałego CPG RNA	60
4.1.3 Oczyszczanie oligonukleotydów RNA i 2'OMe RNA	60
<b>4.2 Znakowanie RNA w pozycji 5' fosforem <math>^{32}P</math></b>	<b>63</b>
<b>4.3 Reakcje prowadzone na podłożu stałym CPG</b>	<b>64</b>
4.3.1 Reakcje prowadzone z 2'-deoksyadenozyną zawierającą łąchnik 6-	

aminoheksylowy na końcu 5'	64
4.3.2 Reakcje prowadzone z pentamerem-2'-deoksyadenozyny zawierającym łącznik 6-aminoheksylowy na końcu 5'	66
4.3.3 Reakcje prowadzone z oligonukleotydem pPSR VI	67
4.4 Reakcje prowadzone w roztworze	68
4.5 Hydroliza RNA – procedury ogólne	72
<b>V. OMÓWIENIE WYNIKÓW</b>	<b>75</b>
1. Związki kompleksowe lantanowców(III) zawierające salenowe zasady Schiffa.	76
2. Związki kompleksowe lantanowców(III) zawierające hydrazonowe zasady Schiffa	92
2.1 Związki kompleksowe lantanowców(III) z 2,6-diacetylopirydyno-bis(2-aminobenzoilohydrazonem) – ligand L <sup>3</sup>	92
2.2 Związki kompleksowe lantanowców(III) z 2,6-diacetylopirydyno-(2-aminobenzoilohydrazonem) (L <sup>4</sup> )	106
3. Syntetyczne rybonukleazy	113
3.1 Badania wstępne	113
3.2 Badania docelowe	117
4. Reakcje hydrolizy RNA 18 i RNA 21	128
4.1 Reakcje hydrolizy prowadzone za pomocą syntetycznej rybonukleazy	128
4.2 Reakcje hydrolizy prowadzone za pomocą związków kompleksowych	133
<b>VI. PODSUMOWANIE WYNIKÓW</b>	<b>142</b>
<b>VII. BIBLIOGRAFIA</b>	<b>146</b>





# I. WSTĘP I CEL PRACY

Układy biologiczne zawierające jony metali lub funkcjonujące w ich obecności, przez długi czas stanowiły dla człowieka dużą zagadkę. Zastosowanie związków kompleksowych metali *d* i *f*-elektronowych jako prostych modeli metaloprotein w wielu przypadkach pozwoliło na ustalenie mechanizmu ich działania. Obecny stan wiedzy pozwala nie tylko tworzyć układy modelowe, ale także sterować nimi. Dąży się do otrzymania nowych związków kompleksowych, które ze względu na swoje właściwości można wykorzystać w katalizie, farmacji, medycynie. Szczególnym zainteresowaniem cieszą się związki kompleksowe typu zasad Schiffa. Ligandy typu zasad Schiffa projektuje się w ten sposób by w dużym stopniu przypominały związki występujące w naturze. Wykazują one specyficzne właściwości kompleksotwórcze oraz aktywność biologiczną. Badanie układów modelowych opartych na kompleksach jonów metali umożliwia zrozumienie wielu skomplikowanych procesów zachodzących w żywych organizmach. Możliwość wykorzystania kompleksów lantanowców typu zasad Schiffa jako syntetyczne rybonukleazy w selektywnej katalizie reakcji hydrolizy wiązania fosfodiesterowego w kwasach nukleinowych skłoniła mnie do podjęcia badań nad tą specyficzną właściwością tych związków.

Cel niniejszej pracy obejmuje trzy kierunki działań. Pierwszy to synteza i charakterystyka nowych związków kompleksowych lantanowców zawierających salenowe i hydrazonowe ligandy typu zasad Schiffa. Drugim jest zbadanie właściwości hydrolitycznych tych kompleksów oraz kompleksów lantanowców, których synteza i charakterystyka została opublikowana w ostatnich latach przez członków zespołu naukowego prof. Wandy Radeckiej-Paryzek. Trzeci kierunek dotyczy opracowania najdogodniejszej metody syntezy prekursora syntetycznej rybonukleazy oraz zbadania jego właściwości

hydrolitycznych względem wiązania O-P-O w RNA. Zagadnienia związane z hydrolizą RNA są niezwykle ciekawe ze względu na możliwość wykorzystania ich w terapii niektórych chorób genetycznych.

W niniejszej pracy część literaturową oraz omówienie wyników podzielono na dwie części. Pierwsza dotyczy syntezy i charakterystyki salenowych i hydrazonowych związków kompleksowych lantanowców typu zasad Schiffa, druga natomiast związana jest z zastosowaniem jonów lantanowców oraz kompleksów lantanowców jako syntetyczne rybonukleazy.

## II. SKRÓTY STOSOWANE W PRACY

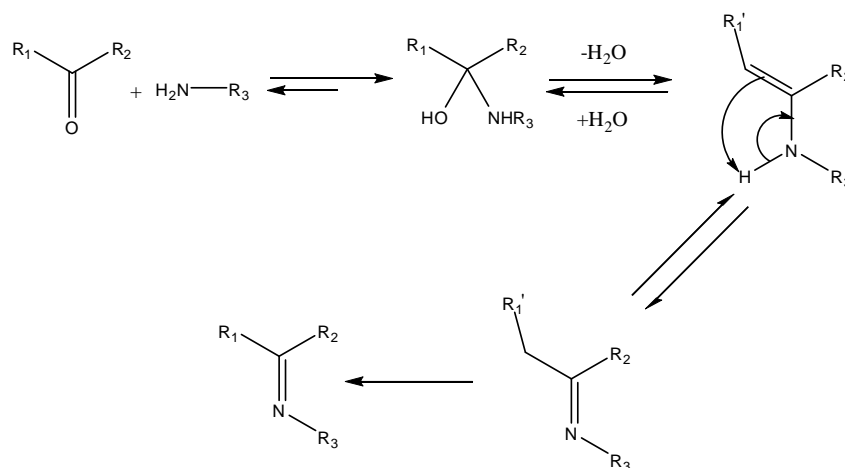
2'OMe RNA	- kwas rybonukleinowy metylowany w pozycji 2'
AcOH	- kwas octowy
APS	- nadsiarczan(VI) amonu $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$
BB	- barwnik bromofenylowy
$\text{CDCl}_3$	- deuterowany chloroform
CPG	- podłoże stałe
DCC	- dicykloheksylokarboimid
DIPETA	- diizopropylometyloamina
DMA	- dimetyloamina
DMAP	- 4-dimetyloaminopirydyna
DMF	- dimetyloformamid
DMSO	- dimetylosulfotlenek
EDTA	- kwas etylenodiaminatetraoctowy
ESI	- spektroskopia masowa stosująca jako jonizację elektrorozpylanie (z ang. <i>Electrospray Ionization</i> )
$\text{Et}_3\text{N}$	- trietyloamina
EtOH	- etanol
$\text{H}_2\text{L}^1\text{-L}^4$	- oznacza ligandy w kompleksach otrzymanych w niniejszej pracy
HPLC	- wysokosprawną chromatografię cieczową (ang. <i>High Performance Liquid Chromatography</i> )
L1-L25	- oznacza ligandy występujące w cytowanych publikacjach
Ln	- lantanowiec(III)
MA	- metyloamina
MALDI	- spektrometria masowa stosująca jako jonizację desorpcję laserową z udziałem matrycy (z ang. <i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation</i> )
MeOH	- metanol
MJD	- choroba Machado-Josepha (z ang. <i>Machado-Joseph disease</i> )
NMR	- rezonans magnetyczny jądra
PAA	- żel poliakryloamidowy

PNK	- bufor stosowany do hydrolizy RNA pod wpływem kinazy T <sub>4</sub> (z ang. <i>Polynucleotide Buffer</i> )
pPSR	- prekursor syntetycznej rybonukleazy na podłożu CPG
PSR	- prekursor syntetycznej rybonukleazy
TEMED	- <i>N,N,N',N'</i> -tetrametyloetylenodiamina
THF	- tetrahydrofuran
TLC	- chromatografia cienkowarstwowa (z ang. <i>Thin layer chromatography</i> )
Tris	- Tris(hydroksymetylo)aminometan

### III. CZĘŚĆ LITERATUROWA

#### 1. Związki kompleksowe lantanowców zawierające salenowe i hydrazonowe ligandy typu zasad Schiffa

Kompleksy typu zasad Schiffa to związki zawierające w swej strukturze ligandy z podwójnym wiązaniem C=N, zwanym wiązaniem iminowym. Nazwa pochodzi od ich odkrywcy niemieckiego uczonego Hugo Schiffa (1834-1915).[1] Związki te otrzymuje się w wyniku reakcji kondensacji, której pierwszym etapem jest nukleofilowy atak pierwszorzędowej grupy aminowej na karbonylowy atom węgla (Rysunek 1). Powstaje wówczas hydroksyamina, z której po eliminacji cząsteczki wody



Rysunek 1.

tworzy się enamina. Efektem tautomerizacji iminowo-enaminowej jest związek typu zasad Schiffa.[2]

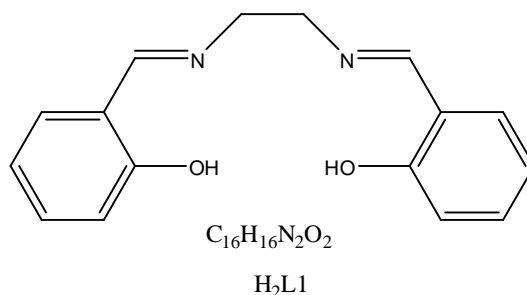
Wyróżniamy dwie metody otrzymywania związków kompleksowych lantanowców typu zasad Schiffa: metodę templatową (reakcje kondensacji *in situ*) i metodę bezpośrednią.[3]

Salenowe i hydrazonowe kompleksy lantanowców przyczyniają się do szybkiego rozwoju takich dziedzin jak biotechnologia czy biologia molekularna.[4-10] Znajdują zastosowanie jako modele metaloprotein, środki terapeutyczne, wysoko selektywne katalizatory, składniki budulcowe w konstrukcji materiałów ciekłokrystalicznych, polimery koordynacyjne o potencjalnych właściwościach katalitycznych, luminescencyjnych, magnetycznych czy optycznych.[11-22]

## 1.1 Przykłady kompleksów lantanowców zawierających ligandy salenowe

Ligandy salenowe typu zasad Schiffa wywodzą się z aldehydu salicylowego lub jego pochodnych oraz amin (lub diamin). Zastosowanie różnych pochodnych aldehydu salicylowego oraz aminy (lub diamin) do syntezy ligandów i skompleksowanie ich z jonami lantanowców daje szeroki wachlarz możliwości otrzymania związków o ciekawych właściwościach fizykochemicznych i strukturalnych i wykorzystania ich w różnych dziedzinach nauki.

Ligand  $H_2L1$  otrzymano w wyniku reakcji kondensacji [2+1] dwóch cząsteczek aldehydu salicylowego lub i jednej cząsteczki etylenodiaminy (Rysunek 3).[23]



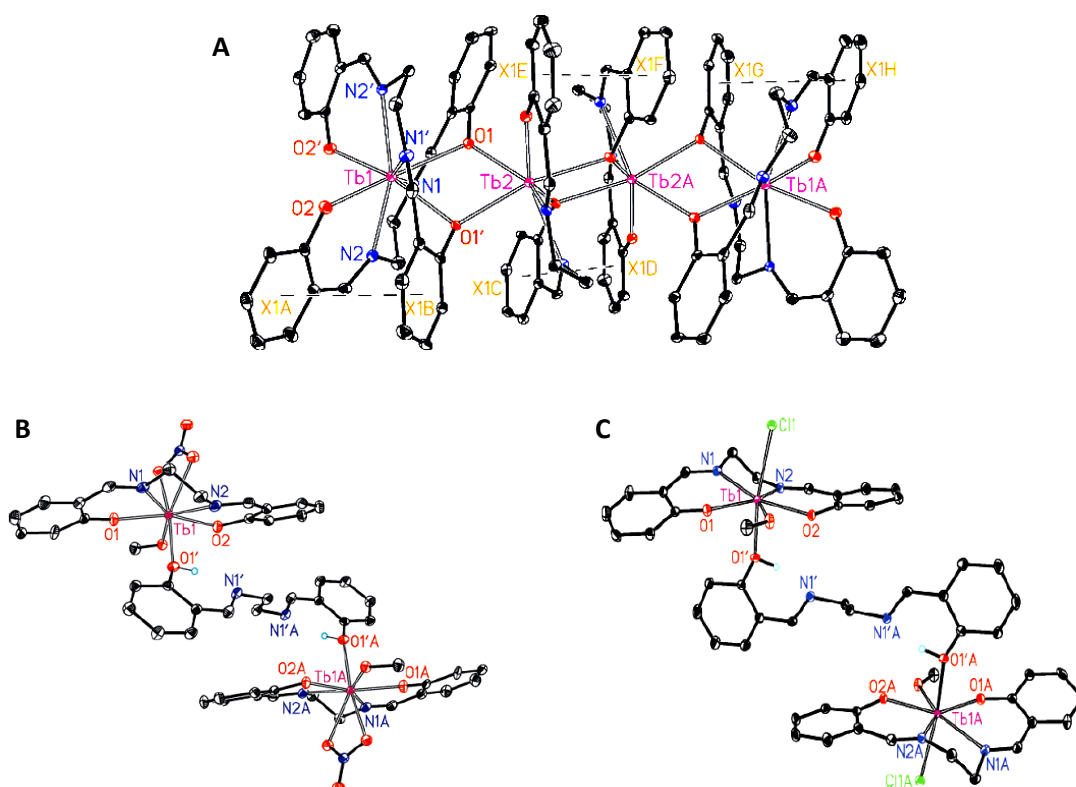
Rysunek 3.

Zsyntezowany ligand  $H_2L1$  wykorzystano do reakcji z octanem, azotanem(V) lub chlorkiem terbu(III), w wyniku czego otrzymano związki kompleksowe o różnym składzie

(podczas syntezy stosunek ligandu do jonu lantanowca w każdym przypadku wynosił 3:2).

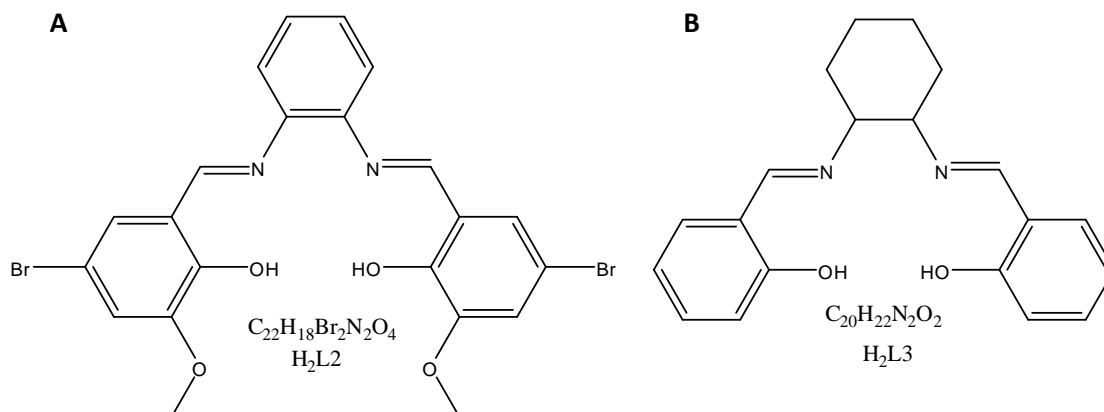
W przypadku zastosowania octanu terbu(III) otrzymano związek kompleksowy o ciekawej strukturze. Zawiera on sześć cząsteczek ligandu i cztery jony terbu(III)  $Tb_4(L1)_6 \cdot 6MeOH \cdot 4H_2O$ . W sferę koordynacyjną zewnętrznych jonów terbu(III) Tb1 i Tb1A (Rysunek 4A), mających liczbę koordynacyjną 8, wchodzi dwie cząsteczki ligandu  $H_2L1$   $N_2O_2$ -donorowego. Natomiast wewnętrzne jony terbu(III) Tb2 i Tb2A mają liczbę koordynacyjną 7, a sferę koordynacyjną wypełnia jeden  $N_2O_2$ -donorowy ligand  $H_2L1$  oraz trzy fenyłowe atomy tlenu z trzech ligandów  $H_2L1$ .

Zastosowanie azotanowych(V) i chlorkowych soli terbu(III) przyczyniło się do otrzymania związków kompleksowych zawierających w swej strukturze trzy cząsteczki ligandu i dwa jony terbu(III)  $[Tb(L1)(NO_3)(MeOH)]_2(\mu-H_2L1)$  i  $[Tb(L1)Cl(MeOH)]_2(\mu-H_2L1)$ . Jedna cząsteczka ligandu pełni rolę łącznika pomiędzy dwoma jonami centralnymi (Rysunek 4B i C).[24] Liczba koordynacyjna jonów centralnych dla poszczególnych kompleksów  $[Tb(L1)(NO_3)(MeOH)]_2(\mu-H_2L1)$  i  $[Tb(L1)Cl(MeOH)]_2(\mu-H_2L1)$  wynosi odpowiednio 8 i 7.



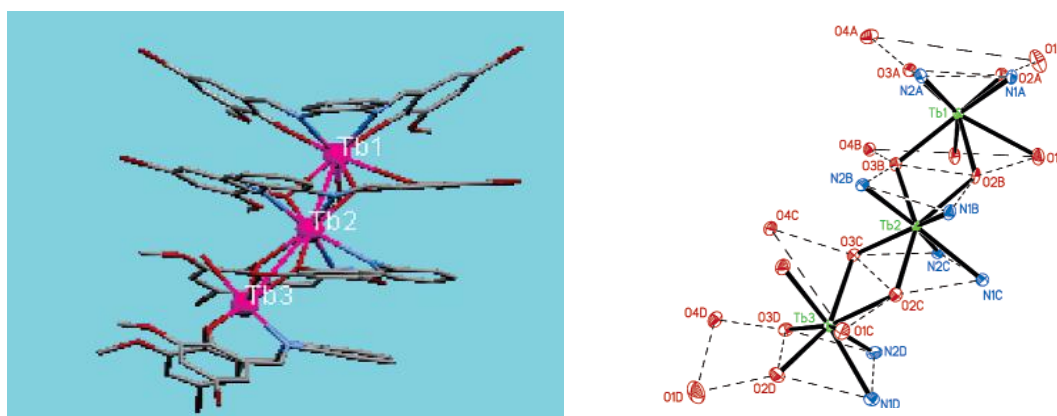
Rysunek 4.

Związek kompleksowy  $[\text{Tb}_3(\text{L2})_4(\text{H}_2\text{O})_2]\text{Cl}$  otrzymano w wyniku reakcji ligandu  $\text{H}_2\text{L2}$  (Rysunek 5A) z chlorkiem terbu(III).[25] Otrzymany związek ma strukturę sandwiczową. Zewnętrzne jony terbu(III) Tb(1) i Tb(3) (Rysunek 6) mają podobną sferę koordynacyjną.



Rysunek 5.

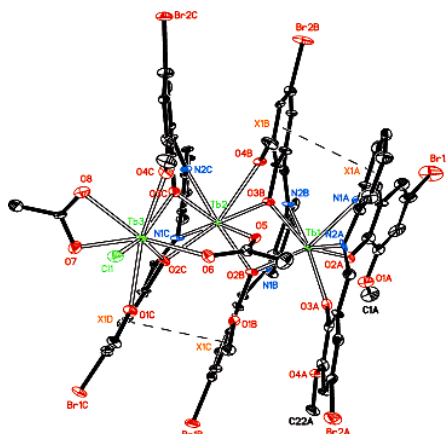
Liczba koordynacyjna wynosi 9, a atomy donorowe pochodzą od jednego zewnętrznego  $\text{N}_2\text{O}_2$ -donorowego liganda  $\text{H}_2\text{L2}$  i jednego wewnętrznego  $\text{O}_2\text{O}_2$ -donorowego ligandu  $\text{H}_2\text{L2}$  oraz jednej cząsteczki wody.



Rysunek 6.

Udowodniono, że zastosowanie dodatku octanu cynku w reakcji ligandu  $\text{H}_2\text{L2}$  z chlorkiem terbu(III) spowodowało otrzymanie kompleksu  $[\text{Tb}_3(\text{L2})_3(\text{OAc})_2\text{Cl}]$ , w którym jeden zewnętrzny ligand i cząsteczki wody z kompleksu  $[\text{Tb}_3(\text{L2})_4(\text{H}_2\text{O})_2]\text{Cl}$  zostały zastąpione dwoma jonami octanowymi oraz jonem chlorkowym (Rysunek 7).

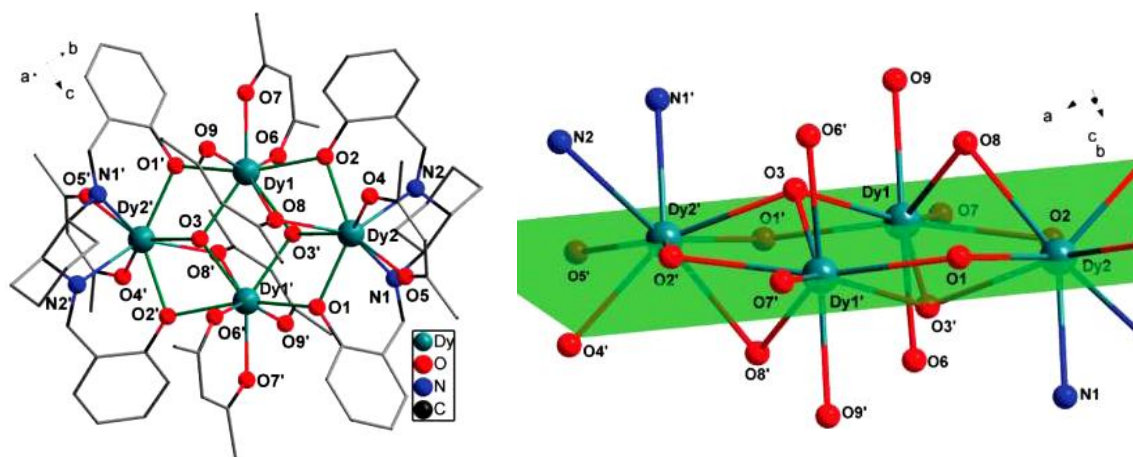




Rysunek 7.

W reakcjach syntezy kompleksów, w których stosuje się uwodnione sole lantanowców(III) produktami często są hydroksykompleksy. Jony hydroksylowe powstają w wyniku hydrolizy zastosowanej soli lantanowca. Otrzymane kompleksy zawierają wówczas mieszane przeciwjony, zarówno aniony hydroksylowe jak i aniony pochodzące od zastosowanej soli.

Czterordzeniowy hydroksykompleks dysprozu(III)  $[Dy_4(\mu_3-OH)_2(L3)_2(acac)_6]$  otrzymano w reakcji ligandu  $H_2L3$  (Rysunek 5B) z acetyloacetonem dysprozu(III). Wszystkie jony dysprozu(III) mają liczbę koordynacyjną 8 i leżą w jednej płaszczyźnie (Rysunek 8).[26]

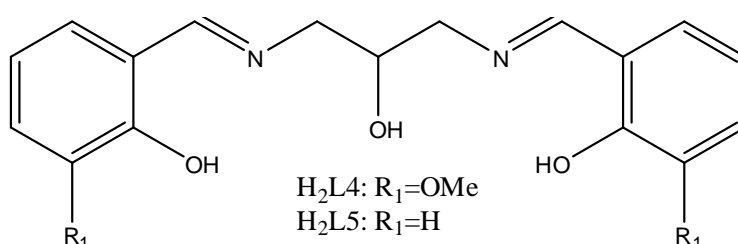


Rysunek 8.

Połączone są za pomocą dwóch atomów tlenu (O(3), O(3')) pochodzących z anionów hydroksylowych. W skład sfery koordynacyjnej wchodzi także donorowe atomy tlenu pochodzące od acetyloacetonu oraz atomy tlenu grup hydroksylowych z pierścienia

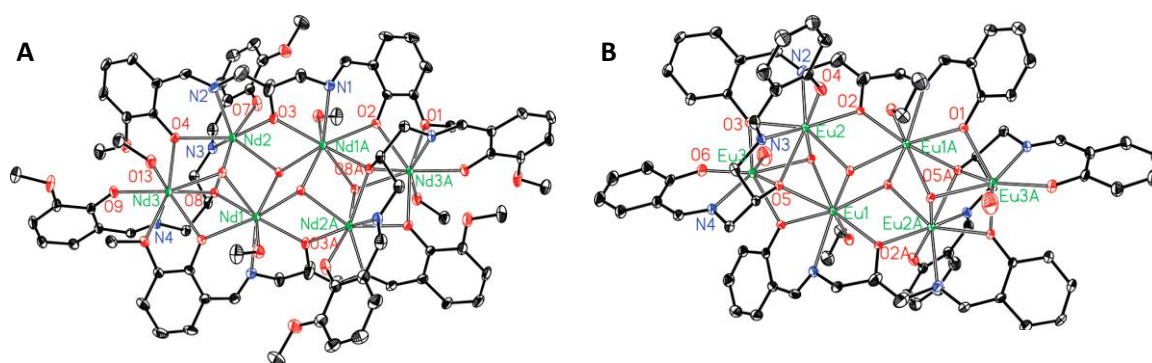
aromatycznego liganda  $H_2L3$ . Zewnętrzne jony dysprozu(III)  $Dy(2)$  i  $Dy(2')$  koordynują z  $N_2O_2$ -donorowym ligandem  $H_2L3$ .

W wyniku reakcji liganda  $H_2L4$  z chlorkiem neodymu(III) lub terbu(III) oraz reakcji liganda  $H_2L5$  (Rysunek 9) z chlorkiem europu(III) lub erbu(III) otrzymano sześciordzeniowe związki kompleksowe o wzorach sumarycznych  $[Nd_6(L4)_4(OH)_4(MeOH)_4] \cdot 2Cl \cdot 4MeOH$ ,  $[Tb_6(L4)_4(OH)_4(MeOH)_4] \cdot 2Cl \cdot 4MeOH$ ,  $[Eu_6(L5)_4(OH)_4(MeOH)_2(EtOH)_2(H_2O)_2] \cdot 2Cl \cdot 3EtOH \cdot H_2O$  i  $[Er_6(L5)_4(OH)_4(EtOH)_2(H_2O)_2] \cdot 2Cl \cdot 2EtOH \cdot MeOH \cdot H_2O$ . [27]



Rysunek 9.

Badania wykazały, że kompleksy neodymu(III) i terbu(III) z ligandem  $H_2L4$  są izomorficzne. Na rysunku 10A przedstawiona została struktura krystaliczna kompleksu  $[Nd_6(L4)_4(OH)_4(MeOH)_4] \cdot 2Cl \cdot 4MeOH$ . Składa się on z dwóch centrosymetrycznych rdzeni



Rysunek 10.

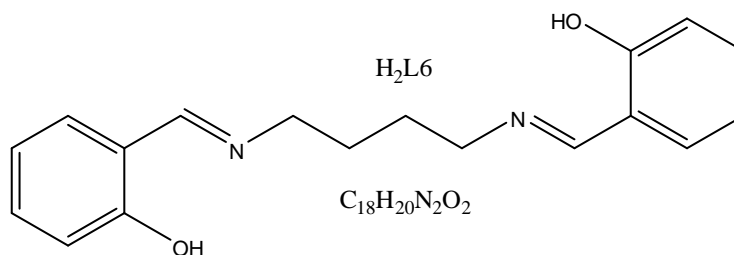
$Nd_3(L4)_2$ , które połączone są ze sobą za pomocą dwóch anionów mostkujących  $\mu_3-OH^-$ . Każdy anion  $\mu_3-OH^-$  łączy trzy jony neodymu(III). Wszystkie jony neodymu(III) mają liczbę koordynacyjną 8. Jony  $Nd(2)$  i  $Nd(3)$  koordynują z trzema zasadami Schifffa, podczas gdy

Nd(1) skoordynowany jest z dwoma zasadami Schiffa, a w jego sferze koordynacyjnej znajdują się dodatkowo dwa mostkujące aniony  $\mu_3\text{-OH}^-$  oraz jedna cząsteczka metanolu. Struktury krystaliczne kompleksów europu(III) i erbu(III) z ligandem  $\text{H}_2\text{L5}$  są izomorficzne, a sposób koordynacji jonów centralnych Eu(1), Eu(2) i Eu(3) (Rysunek 10B) jest podobny do występującego w kompleksie neodymu(III) z ligandem  $\text{H}_2\text{L4}$ . Jony Eu(1) i Eu(2) mają liczbę koordynacyjną 8; cząsteczka metanolu, występująca w kompleksie neodymu(III) z ligandem  $\text{H}_2\text{L4}$  została zastąpiona cząsteczką etanolu.

Powyższe przykłady wskazują na ważną rolę przeciwjonów w syntezie związków kompleksowych. Niejednokrotnie wpływają one na rozmieszczenie cząsteczek w przestrzeni, stosunek metal:ligand i skład sfery koordynacyjnej jonu centralnego, o którym decyduje przede wszystkim układ atomów donorowych w ligandzie, użyty jon metalu, a także cząsteczki rozpuszczalnika.

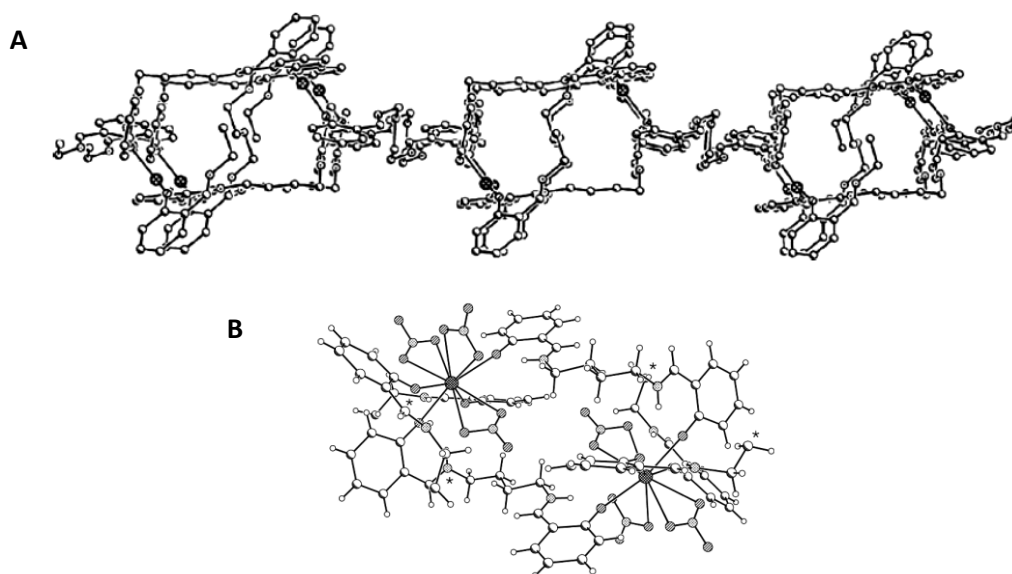
Zastosowanie w syntezie giętkiej diaminy (1,2-etylenodiaminy, 1-metylo-1,2-etylenodiaminy, putrescyny) może prowadzić do otrzymania polimerowych związków kompleksowych. Świadczy to o znaczeniu natury ligandu w procesie samoorganizacji cząsteczek, który może spełniać rolę ligandu mostkującego.[30] Na proces samoorganizacji wpływają także zastosowane rozpuszczalniki, rodzaj jonu lantanowca oraz warunki prowadzenia reakcji. Użycie mniej giętkich diamin aromatycznych doprowadza do otrzymania skończonych dwu lub czterordzeniowych struktur.

Związek kompleksowy lantanu(III) o wzorze sumarycznym  $[\text{La}_2(\text{L6})_4(\text{NO}_3)_6]_\infty$  otrzymano w wyniku reakcji kondensacji [2+1] dwóch cząsteczek aldehydu salicylowego i jednej cząsteczki putrescyny w obecności azotanu(V) lantanu(III). Ligand  $\text{H}_2\text{L6}$  zawiera cztery potencjalne atomy donorowe: dwa atomy tlenu pochodzące od grupy hydroksylowej i dwa atomy azotu pochodzące z grupy iminowej (Rysunek 11).[28]



Rysunek 11.

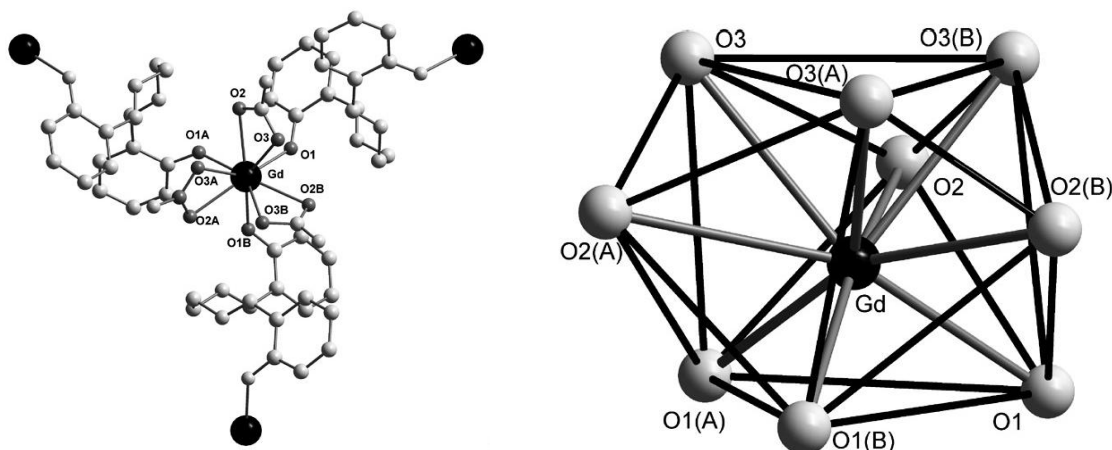
Związek kompleksowy tworzy strukturę dwuwymiarowego polimeru koordynacyjnego (Rysunek 12A). Jest to pierwszy przykład takiej struktury związku kompleksowego lantanowca(III) zawierającego salenową zasadę Schiffa. Wywodzi się ona z aldehydu salicylowego i kadaweryny. Strukturę polimeryczną tworzą ligandy  $H_2L6$  koordynujące wyłącznie poprzez atomy tlenu i mostkujące 10-koordynacyjne jony lantanu(III), których sfera koordynacyjna uzupełniona jest dwufunkcyjnymi jonami azotanowymi(V) (Rysunek 12B). Geometrie wokół jonów centralnych określono jako zniekształcony podwójnie centrowany dodekaedr.



Rysunek 12.

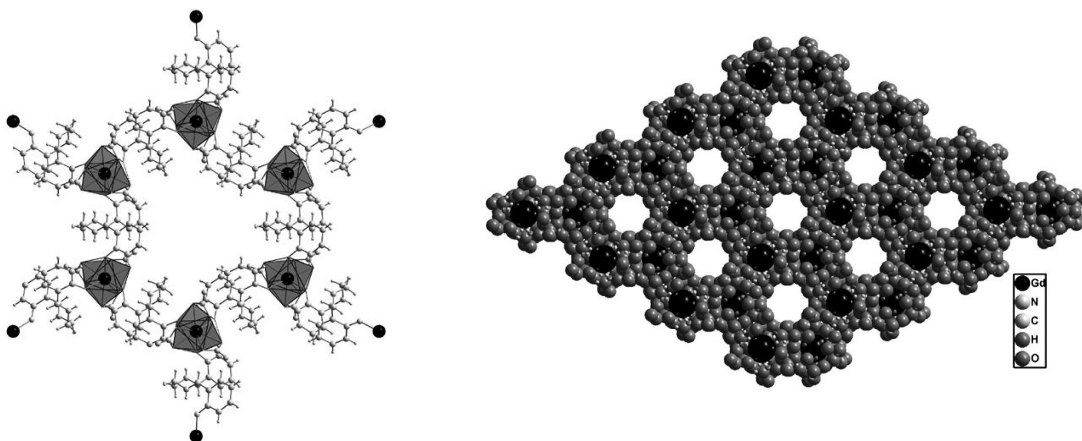
Spektroskopia w podczerwieni wykazała, że jony azotanowe(V) skoordynowane są z jonem centralnym za pomocą dwóch atomów tlenu, co potwierdziła analiza rentgenostrukturalna. W skład wewnętrznej sfery koordynacyjnej lantanu(III) wchodzi sześć atomów tlenu pochodzących od trzech jonów azotanowych(V) oraz cztery atomy tlenu, po jednym z każdej z czterech części ligandu  $H_2L6$ .

Polimeryczne związki kompleksowe gadolinu(III) i dysprozu(III) o wzorze sumarycznym  $[Ln(H_2L1)_{1.5}(NO_3)_3]_n$  otrzymano w reakcji ligandu  $H_2L1$  (Rysunek 3) z azotanową(V) solą odpowiedniego lantanowca.[29] Związki kompleksowe gadolinu(III) i dysprozu(III) są izomorficzne, a wszystkie jony mają liczbę koordynacyjną dziewięć. Geometria wokół jonu centralnego to trygonalny pryzmat potrójnie centrowany (Rysunek 13).



Rysunek 13.

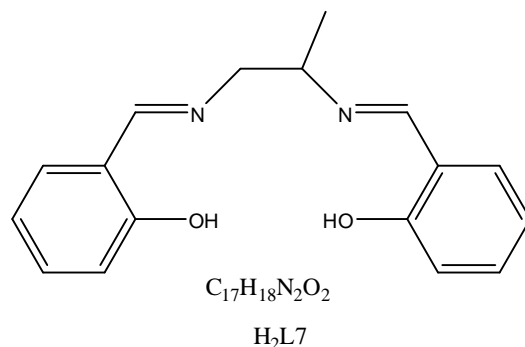
Jon gadolinu(III) lub dysprozu(III) w monomerze koordynuje z trzema donorowymi atomami tlenu z grup fenylowych pochodzących od trzech ligandów  $H_2L1$  oraz trzema dwufunkcyjnymi jonami azotanowymi(V). Każdy ligand  $H_2L1$  w związku kompleksowym gadolinu(III) lub dysprozu(III) jest ligandem mostkującym, łączącym poszczególne monomery poprzez koordynację za pomocą fenylowych atomów tlenu z poszczególnymi jonami lantanowców. Dzięki temu tworzy się dwuwymiarowy polimer koordynacyjny (Rysunek 14).



Rysunek 14.

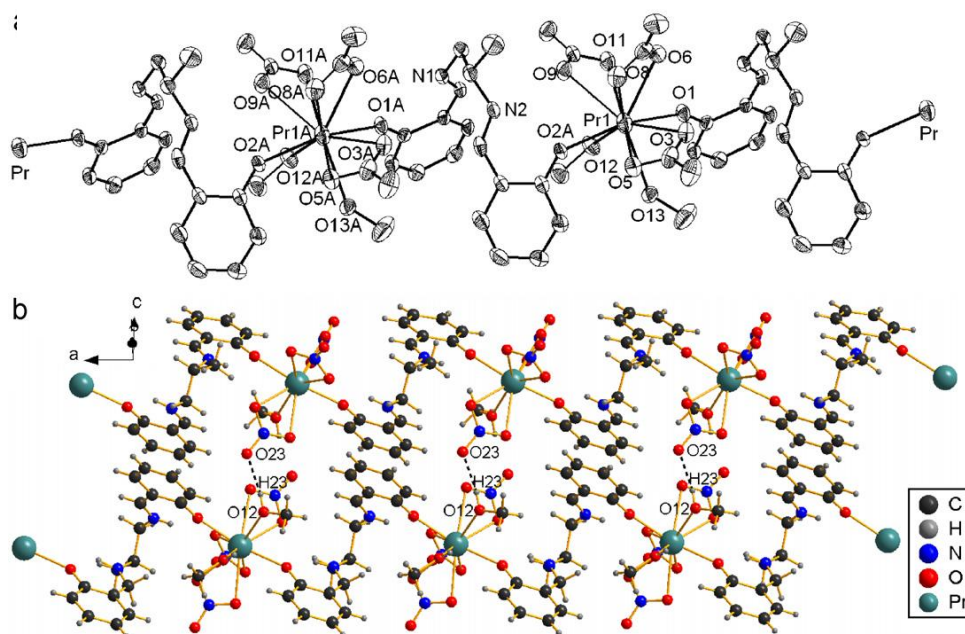
Polimeryczne związki kompleksowe lantanu(III) i prazeodymu(III) o wzorach sumarycznych  $[La(H_2L7)_{1.5}(NO_3)_3]_n$  i  $[Pr(H_2L7)(NO_3)_3(MeOH)]_n$  otrzymano w reakcji azotanowych(V) soli odpowiednich lantanowców z ligandem  $H_2L7$  (Rysunek 15).[30] Kompleks lantanu(III) zawierający ligand  $H_2L7$  jest podobny do polimerycznych

kompleksów gadolinu(III) i dysprozu(III) zawierających ligand  $H_2L1$ . Krystalizują one w tej samej grupie krystalicznej, a koordynacja jonu centralnego zachodzi w ten sam sposób.



Rysunek 15.

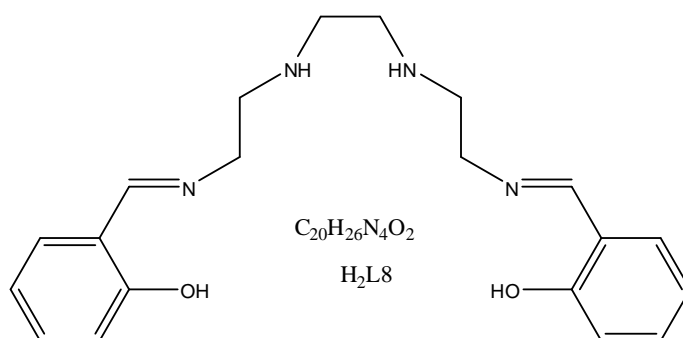
Polimeryczny związek kompleksowy prazeodymu(III)  $[Pr(H_2L7)(NO_3)_3(MeOH)]_n$  ma natomiast kształt łańcuchów składających się z mostkującego ligandu  $H_2L7$  łączącego jony prazeodymu(III) poprzez koordynację przez fenyłowe atomy tlenu (Rysunek 16). Każdy jon prazeodymu(III) ma liczbę koordynacyjną 10 i geometrię odkształconego szesnastościanu. W skład sfery koordynacyjnej wchodzi dwa fenyłowe atomy tlenu z dwóch różnych ligandów  $H_2L7$ , dwa atomy tlenu pochodzące od metanolu i sześć atomów tlenu pochodzących od trzech dwufunkcyjnych jonów azotanowych(V). Poszczególne łańcuchy połączone są ze sobą za pomocą wiązań wodorowych.



Rysunek 16.

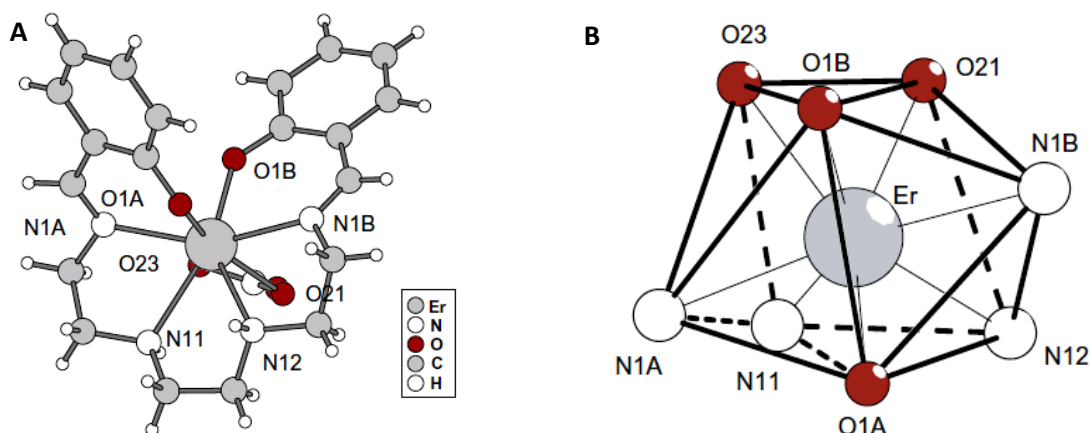
Polimeryczne związki kompleksowe lantanu(III), prazeodymu(III), gadolinu(III) i dysprozu(III) charakteryzują się silną luminescencją widoczną już przy użyciu laboratoryjnej lampy UV-vis przy długości fali  $\lambda=365\text{nm}$ .

W wyniku reakcji kondensacji [2+1] dwóch cząsteczek aldehydu salicylowego i jednej cząsteczki trietylenotetraaminy w obecności azotanu(V) erbu(III) (Rysunek 17) otrzymano związek kompleksowy zawierający ligand  $\text{H}_2\text{L8}$  o wzorze sumarycznym  $[\text{Er}(\text{NO}_3)_2\text{L8}]$  (Rysunek 18A).[31]



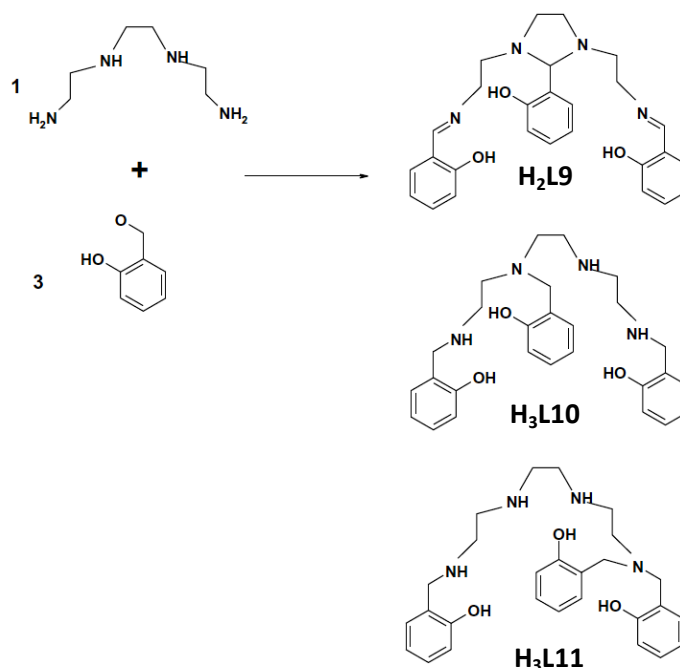
Rysunek 17.

W otrzymanym związku kompleksowym stosunek ligandu  $\text{N}_4\text{O}_2$ -donorowego do jonu centralnego wynosi 1:1. Ładunek jonu metalu równoważony jest przez deprotonację grup hydroksylowych oraz jeden jon azotanowy(V). Spektroskopia w podczerwieni potwierdziła fakt występowania jonów azotanowych(V) dwukleszczowych. Liczba koordynacyjna jonu centralnego wynosi 8, a geometria wokół jonu centralnego to podwójnie centrowany pryzmat trygonalny (Rysunek 18B).[32]



Rysunek 18.

Wykazano także, że w zależności od warunków reakcji trzech cząsteczek aldehydu salicylowego i jednej cząsteczki trietylenotetraaminy można otrzymać trzy różne formy ligandu (Rysunek 19), w których trzecia cząsteczka aldehydu salicylowego reaguje z różnymi atomami azotu cząsteczki trietylenotetraaminy.[33]

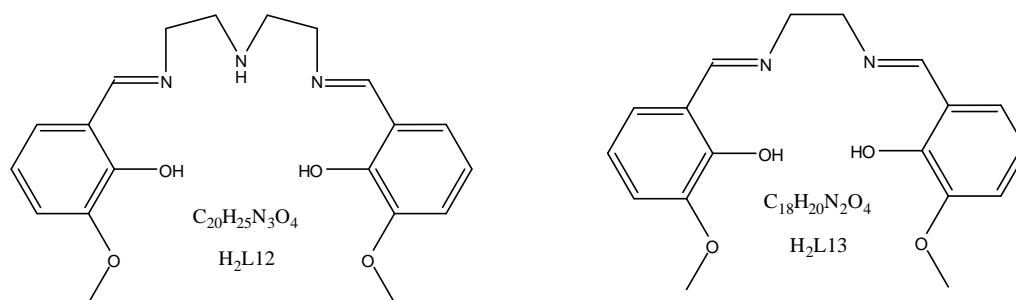


Rysunek 19.

W wyniku takiej syntezy można otrzymać ligandy H<sub>2</sub>L<sub>9</sub>, H<sub>3</sub>L<sub>10</sub> i H<sub>3</sub>L<sub>11</sub>. Po skompleksowaniu ich z jonami lantanowców(III) otrzymano związki kompleksowe o wzorze sumarycznym Ln(H<sub>2</sub>L<sub>9</sub>)(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>, Ln(H<sub>3</sub>L<sub>10</sub>)(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> i Ln(H<sub>3</sub>L<sub>11</sub>)(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>. Wykazano, że związki kompleksowe zawierające ligandy H<sub>3</sub>L<sub>10</sub> i H<sub>3</sub>L<sub>11</sub> są nietrwałe w roztworze i samoistnie przekształcają się w kompleks o wzorze sumarycznym [Ln<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>L<sub>9</sub>)<sub>2</sub>]·n(H<sub>2</sub>O) (n=0-2), tworząc przy tym sandwiczowe związki kompleksowe. Dwa jony lantanowców(III) znajdują się pomiędzy dwoma cząsteczkami ligandu. A grupa hydroksylowa z środkowego aldehydu salicylowego w ligandzie H<sub>2</sub>L<sub>9</sub> łączy dwa jony lantanowców, tworząc mostek tlenowy.[34]

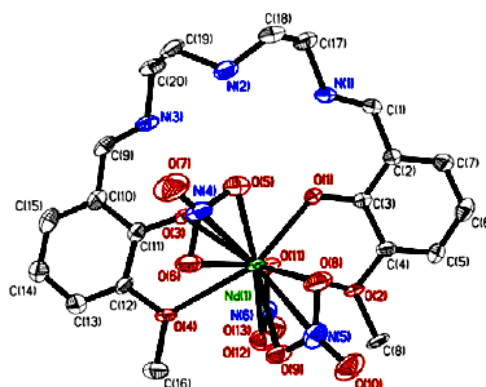
Związek kompleksowy lantanu(III) i neodymu(III) o wzorze sumarycznym, [LnL12(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>] otrzymano w reakcji azotanowych(V) soli odpowiednich lantanowców(III) z ligandem H<sub>2</sub>L12 (Rysunek 20).[35] Kompleksy lantanu(III) i neodymu(III) są izomorficzne, a ich liczba koordynacyjna wynosi 10.





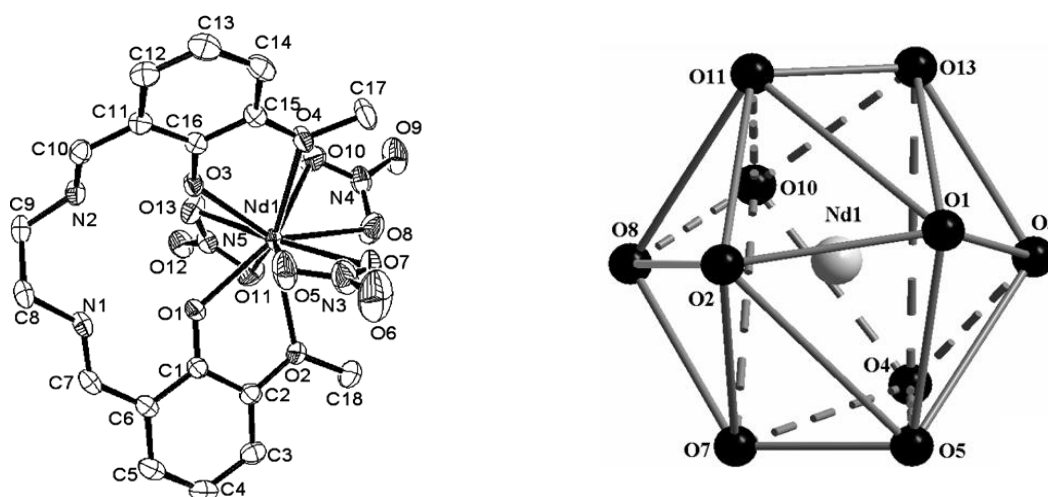
Rysunek 20.

Analiza rentgenostrukturalna wykazała, że donorowe atomy azotu pochodzące od liganda  $\text{H}_2\text{L12}$  nie koordynują z jonem centralnym (Rysunek 21). Udział w koordynacji biorą tylko donorowe atomy tlenu ligandu  $\text{H}_2\text{L12}$  pochodzące z hydroksylowych i metoksyłowych grup przy pierścieniu aromatycznym. Sfera koordynacyjna lantanowców(III) uzupełniona jest przez trzy dwufunkcyjne jony azotanowe(V).



Rysunek 21.

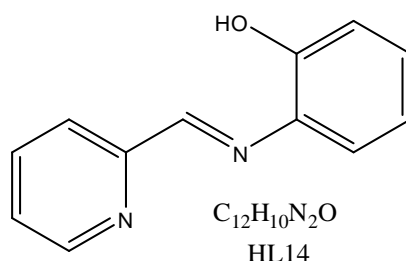
Podobną sytuację spotykamy w przypadku kompleksów neodymu(III), europu(III) i terbu(III) z ligandem  $\text{H}_2\text{L13}$  (Rysunek 20).[36] Kompleksy neodymu(III), europu(III) i terbu(III) o wzorze sumarycznym  $[\text{Ln}(\text{H}_2\text{L13})(\text{NO}_3)_3]$  są izomorficzne, ich liczba koordynacyjna wynosi 10, a geometria wokół jonów centralnych to zniekształcony szesnastościan.  $\text{N}_2\text{O}_4$ -donorowy ligand  $\text{H}_2\text{L13}$  koordynuje z jonami lantanowców(III) tylko za pomocą czterech donorowych atomów tlenu pochodzących od dwóch grup metoksyłowych i hydroksylowych znajdujących się przy pierścieniu aromatycznym. Donorowe atomy azotu z grup iminowych ligandu  $\text{H}_2\text{L13}$  nie biorą udziału w koordynacji. Sferę koordynacyjną jonów lantanowców uzupełniają trzy dwufunkcyjne aniony azotanowe(V) (Rysunek 22).



Rysunek 22.

Ilość i natura potencjalnych atomów donorowych w ligandach ma duży wpływ na to, w którym miejscu jon lantanowca będzie koordynował. Wynika to z teorii twardych i miękkich kwasów i zasad Pearsona. Jony lantanowców(III) jako twarde kwasy preferują donorowe atomy tlenu, które zachowują się jak twarde zasady. Ligandy  $H_2L12$  i  $H_2L13$  (Rysunek 20) mają potencjalnie cztery donorowe atomy tlenu i trzy (ligand  $H_2L12$ ) lub dwa (ligand  $H_2L13$ ) atomy azotu, co pozwala jonom lantanowców koordynować tylko w  $O_4$ -donorowym rdzeniu. Natomiast ligand  $H_2L11$  ma tylko dwa donorowe atomy tlenu i dwa donorowe atomy azotu, co zmusza jony lantanowców, w celu uzyskania wysokich liczb koordynacyjnych, do koordynacji w  $N_2O_2$ -donorowym rdzeniu ligandu  $H_2L11$ .

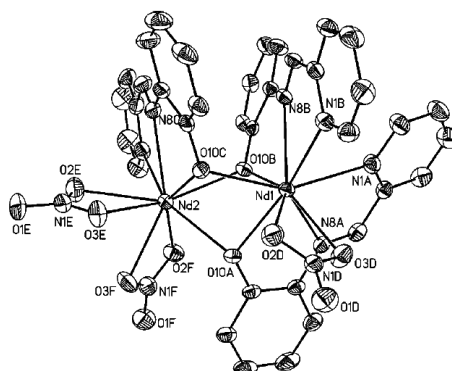
W wyniku reakcji kondensacji jednej cząsteczki 1-amino-2-hydroksybenzenu z aldehydem 2-pirydynowym otrzymano ligand HL14 (Rysunek 23).[37,38]



Rysunek 23.

Ligand HL14 wykorzystano do syntezy związków kompleksowych lantanowców(III) (neodym(III), europ(III) i dysproz(III)), które zawierają w swej strukturze dwa jony

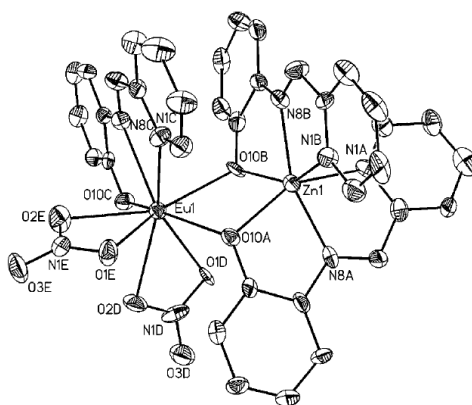
lantanowca(III), trzy deprotonowane cząsteczki ligandu L14 i trzy jony azotanowe(V). Krysztaly kompleksów neodymu(III), europu(III) i dysprozu(III) z ligandem HL14 są izomorficzne (Rysunek 24).[39]



Rysunek 24.

Liczba koordynacyjna dwóch jonów lantanowca(III) wynosi siedem. Związki te są niesymetryczne, w skład sfery koordynacyjnej jednego z jonów lantanowca(III) wchodzi dwa deprotonowane ligandy L14 i jeden dwukleszczowy jon azotanowy(V), w przypadku drugiego dwa dwukleszczowe jony azotanowe(V) i jeden deprotonowany ligand L14. Wszystkie donorowe atomy tlenu pochodzące z grup hydroksylowych łączą dwa jony lantanowca, tworząc mostki tlenowe.

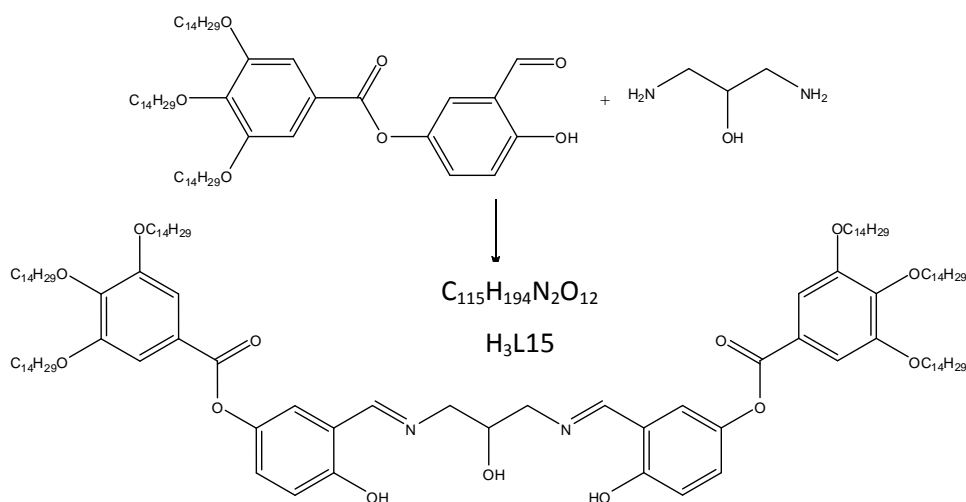
W kompleksie heterodwurdzeniowym zawierającym jon europu(III), cynku i ligand HL14 (Rysunek 25) o wzorze sumarycznym  $[\text{EuZn}(\text{L14})_3(\text{NO}_3)_2]$  jon europu(III) ma liczbę koordynacyjną dziewięć. W skład sfery koordynacyjnej wchodzi dwa dwukleszczowe jony azotanowe(V), jeden  $\text{N}_2\text{O}$ -donorowy ligand L14 oraz dwa atomy tlenu z grupy hydroksylowej pozostałych dwóch cząsteczek ligandu tworzących mostek tlenowy pomiędzy jonem europu(III) i cynku.



Rysunek 25.

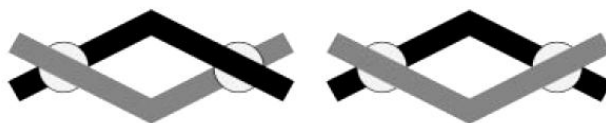
Liczba koordynacyjna jonu cynku wynosi sześć, w skład sfery koordynacyjnej wchodzi dwa  $N_2O$ -donorowe ligandy L14. Geometria wokół jonu cynku to odkształcony oktaedr. Związki kompleksowe heterodwurdzeniowe zawierające w swej strukturze jony metali *d*- i *f*-elektronowych cieszą się dużym zainteresowaniem ze względu na specyficzne właściwości magnetyczne i luminescencyjne.[40,41] Luminescencja kompleksów dwurdzeniowych zawierających jony lantanowców i cynku jest bardzo silna.[42,43]

W wielu badaniach mających na celu otrzymanie związków kompleksowych wykazujących właściwości ciekłych kryształów wykorzystuje się ligandy typu zasad Schiffa wywodzące się z pochodnych aldehydu salicylowego i z odpowiednich diamin.[44-46] Ligand  $H_3L15$  otrzymano w wyniku reakcji kondensacji dwóch cząsteczek aldehydu 3-formylo-4-hydroksyfenylo-3,4,5-tri(tetradecyloksy)-benzoesowego z jedną cząsteczką 1,3-diamino-2-propanolu (Rysunek 26), którą następnie skompleksowano z jonami neodymu(III), samaru(III) i gadolinu(III).



Rysunek 26.

Ogólny wzór otrzymanych kompleksów  $[Ln_2(L15)_2]$  wskazuje, że dwa ligandy są potrójnie deprotonowane i równoważą ładunek dwóch jonów lantanowca(III). Oznacza to, że przeciwjony nie wchodzi w skład związków kompleksowych  $[Ln_2(L15)_2]$ . [47,48] Na rysunku 27 przedstawiono schematycznie dwie możliwe struktury,



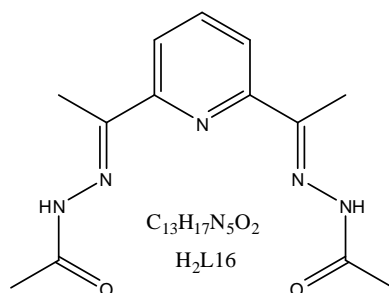
Rysunek 27.

z których wynika, że liczba koordynacyjna jonów lantanowców(III) wynosi sześć, a geometria wokół nich to odkształcony oktaedr. Jest to rzadki przykład, w którym jony lantanowców(III) posiadają tak niską liczbę koordynacyjną. Najczęściej spotykane liczby koordynacyjne dla trójwartościowych jonów lantanowców to 8-12. Udział w tworzeniu wiązań koordynacyjnych biorą trzy atomy tlenu grup hydroksylowych i dwa atomy azotu pochodzące z grup iminowych.

## 1.2 Przykłady kompleksów lantanowców zawierających ligandy hydrazonowe

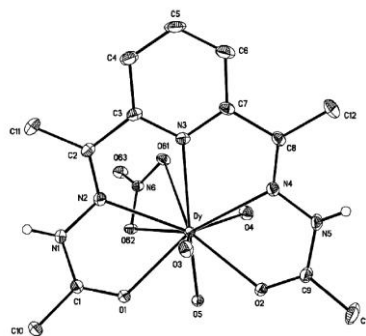
Hydrazonowe ligandy typu zasad Schiffa otrzymuje się w wyniku reakcji hydrazynu  $R_1(C=O)NH-NH_2$  ze związkiem zawierającym grupy ketonowe. Możliwość zastosowania różnych pochodnych hydrazynów i związków ketonowych sprawia, że związki te po skompleksowaniu z jonami lantanowców cieszą się dużym zainteresowaniem.

W wyniku reakcji kondensacji [2+1] dwóch cząsteczek acetylohydrazyny i jednej cząsteczki 2,6-diacetylopirydyny w obecności azotanów(V) lantanowców(III) (dysproz(III), erb(III), gadolin(III), holm(III) i europ(III)) otrzymano związki kompleksowe o wzorze sumarycznym  $Ln(H_2L16)(NO_3)_3 \cdot n(H_2O)$  (Rysunek 28).[49]



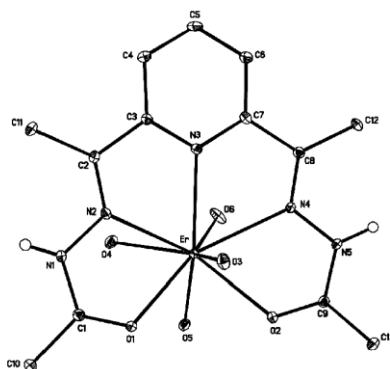
Rysunek 28.

Wykazano za pomocą dyfrakcji promieni rentgenowskich, że kompleksy europu(III), gadolinu(III) i dysprozu(III) z ligandem  $H_2L16$  są izomorficzne. Liczba koordynacyjna kompleksów zawierających ligand  $H_2L16$  wynosi 10: atomy donorowe pochodzą od  $N_3O_2$ -donorowego ligandu  $H_2L16$ , jednego dwukleszczowego jonu azotanowego(V), pozostałe trzy atomy tlenu pochodzą od cząsteczek wody (Rysunek 29). Geometrię wokół jonu centralnego określono jako antypryzmat kwadratowy dwukrotnie centrowany lub czternastościan.[50]



Rysunek 29.

Określono strukturę krystaliczną kompleksów o wzorze sumarycznym  $\text{Ln}(\text{H}_2\text{L16})(\text{NO}_3)_3 \cdot 6(\text{H}_2\text{O})$  ( $\text{Ln}=\text{Ho}$ ,  $\text{Er}$ ). Wykazano, że kompleks holmu(III) i erbu(III) są izomorficzne, a liczba koordynacyjna jonu centralnego wynosi dziewięć (Rysunek 30).

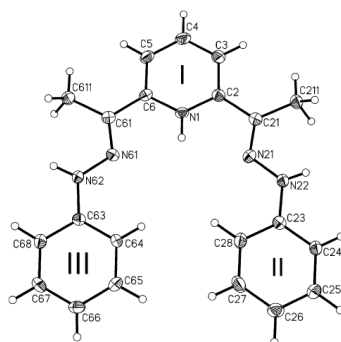


Rysunek 30.

W skład sfery koordynacyjnej wchodzi  $\text{N}_3\text{O}_2$ -donorowy ligand  $\text{H}_2\text{L16}$  oraz cztery donorowe atomy tlenu pochodzące od cząsteczek wody. Geometria wokół jonu centralnego to pryzmat trygonalny potrójnie centrowany.[51] Związki kompleksowe wymienionych wyżej lantanowców(III) są ciekawym przykładem tego, że mimo prowadzenia reakcji w tych samych warunkach otrzymano związki o różnym składzie. Zwraca to uwagę na fakt, że mimo dużego podobieństwa pomiędzy jonami lantanowców(III), często dobór odpowiedniego jonu decyduje o składzie otrzymanego kompleksu.

W wyniku reakcji kondensacji [2+1] dwóch cząsteczek fenylohydrazyny z jedną cząsteczką 2,6-diacetylopirydyny w obecności kwasu chlorowego(VII) otrzymano ligand w postaci soli chloranowej(VII)  $\text{H}_3\text{L17ClO}_4 \cdot 0,5\text{H}_2\text{O}$ , który ma trzy donorowe atomy azotu. Wyznaczono strukturę krystaliczną, z której wynika, że w skład jednej komórki

krystalicznej wchodzi dwa jednoprotowane ligandy  $(H_3L17)^+$ , dwa aniony chloranowe(VII)  $ClO_4^-$  i cząsteczka wody (Rysunek 31).[52]

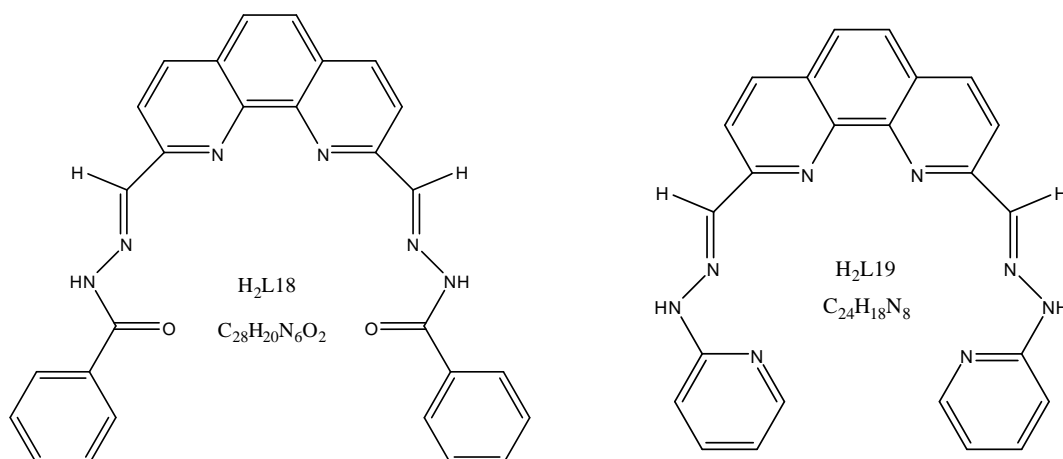


Rysunek 31.

Ligand  $H_3L17ClO_4 \cdot 0,5H_2O$  skompleksowano z chloranami(VII) lantanu(III), prazeodymu(III) i neodymu(III) otrzymując kompleksy o składzie  $La(HL17)_2(ClO_4)_2 \cdot 4H_2O$ ,  $Pr(HL17)_2(ClO_4)_2 \cdot 5H_2O$  i  $Nd(HL17)_2(ClO_4)_2 \cdot 3H_2O$ . Obecność jednego jonu chloranowego(VII) wskazuje, że ładunek na każdym z lantanowców(III) równoważony jest dodatkowo przez dwa jednodeprotonowane ligandy  $(HL17)^-$ . Na podstawie przesunięć pasm absorpcji w spektroskopii w podczerwieni pochodzących od donorowych atomów azotu skompleksowanego liganda, stwierdzono, że atomy te biorą udział w koordynacji z jonem centralnym. Sfera koordynacyjna jonów lantanowców(III) uzupełniana jest przez cząsteczki wody.

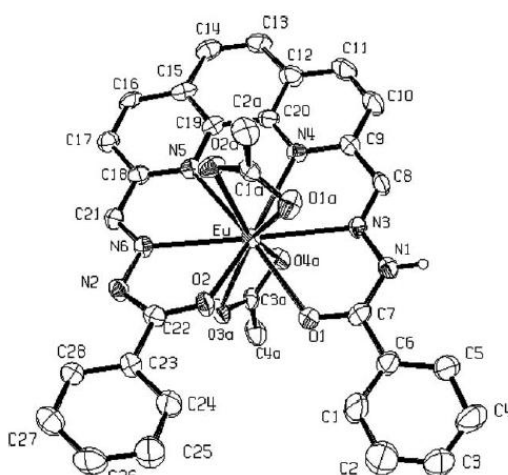
Hydrazonowy związek kompleksowy europu(III)  $Eu(HL18)(CH_3COO)_2 \cdot 5H_2O$  otrzymano w reakcji octanu europu(III) z ligandem  $H_2L18$  (Rysunek 32). Związki kompleksowe lantanu(III), europu(III) i terbu(III)  $[La(H_2L19)(NO_3)_2(H_2O)](NO_3)$ ,  $[Eu(H_2L19)(NO_3)_2](NO_3)$  i  $[Tb(H_2L19)(NO_3)_2](NO_3)$  otrzymano w reakcji azotanowych(V) soli odpowiedniego lantanowca z ligandem  $H_2L19$  (Rysunek 32).[53]





Rysunek 32.

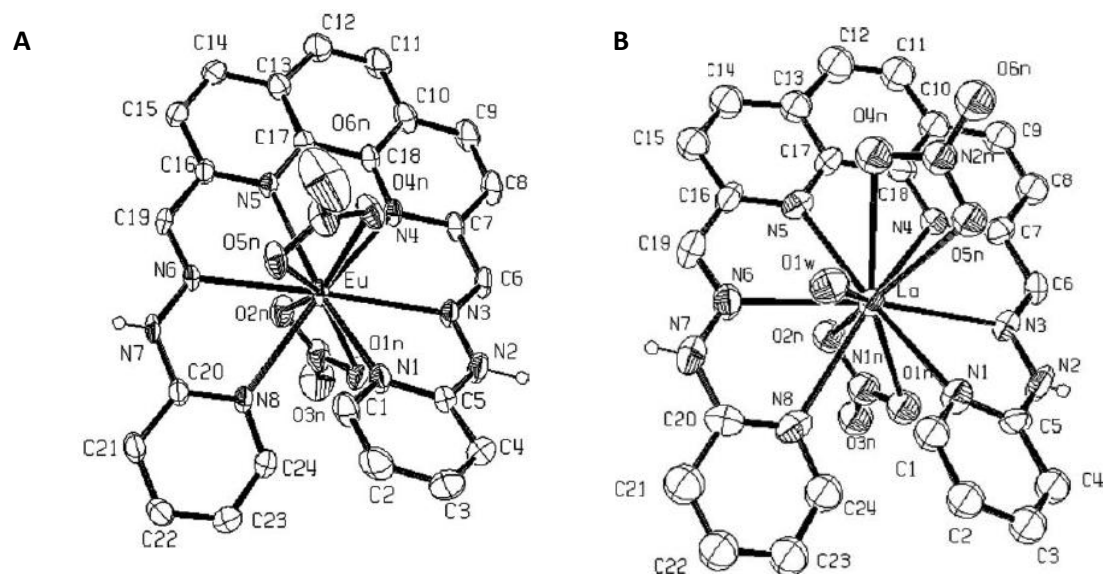
Struktura krystaliczna octanowego kompleksu europu(III) z ligandem  $\text{H}_2\text{L18}$   $\text{Eu}(\text{HL18})(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  potwierdziła jednokrotną deprotonację ligandu  $\text{H}_2\text{L18}$  (Rysunek 33). Jon europu(III) skoordynowany jest z  $\text{N}_4\text{O}_2$ -donorowym ligandem  $\text{H}_2\text{L18}$  oraz dwoma dwufunkcyjnymi jonami octanowymi. Liczba koordynacyjna jonu centralnego wynosi 10. Wiązania pomiędzy donorowymi atomami tlenu z ligandu  $\text{H}_2\text{L18}$  a europem(III)  $\text{Eu-O}$  są krótsze od wiązań  $\text{Eu-N}$ . W związkach kompleksowych metali  $d$ -elektronowych  $\text{Sn}$  i  $\text{Pb}$  występuje sytuacja odwrotna, wiązania pomiędzy  $\text{M-N}$  są krótsze niż wiązania  $\text{M-O}$ . Potwierdza to fakt większego powinowactwa jonów lantanowców do donorowych atomów tlenu (zgodnie z teorią twardych kwasów i zasad).[54]



Rysunek 33.

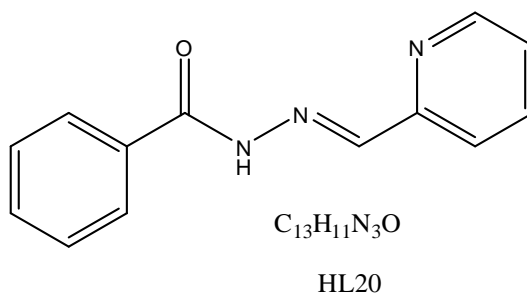
Związki kompleksowe europu(III)  $[\text{Eu}(\text{H}_2\text{L19})(\text{NO}_3)_2](\text{NO}_3)$  i terbu(III)  $[\text{Tb}(\text{H}_2\text{L19})(\text{NO}_3)_2](\text{NO}_3)$  są izomorficzne, a ich liczba koordynacyjna wynosi 10. W skład sfery koordynacyjnej wchodzi N<sub>6</sub>-donorowy ligand H<sub>2</sub>L19 oraz dwa dwufunkcyjne jony azotanowe(V) (Rysunek 34A). W sferze koordynacyjnej jonu lantanu(III) w związku

kompleksowym  $[\text{La}(\text{H}_2\text{L19})(\text{NO}_3)_2(\text{H}_2\text{O})](\text{NO}_3)$  dodatkowo znajduje się jedna cząsteczka wody, a liczba koordynacyjna jonu centralnego wynosi 11 (Rysunek 34B). Liczba koordynacyjna 11 jest rzadko spotykana w kompleksach lantanowców.



Rysunek 34

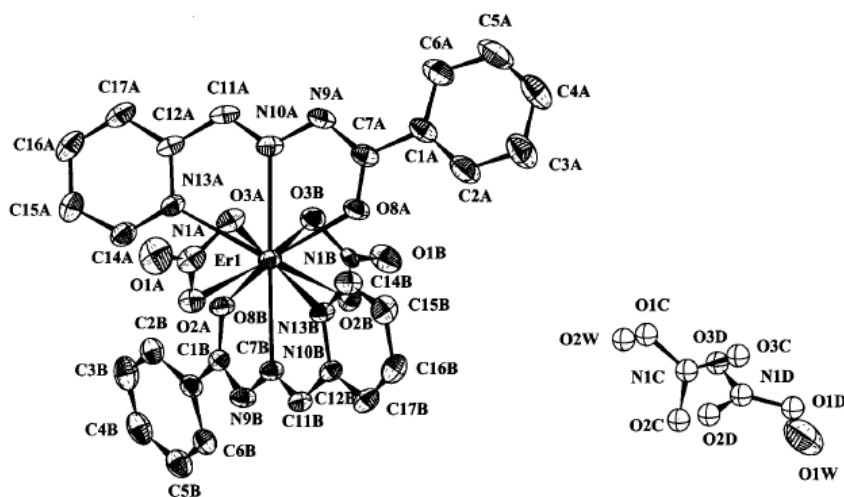
Kompleks erbu(III)  $[\text{Er}(\text{HL20})_2(\text{NO}_3)_2]\text{NO}_3 \cdot 1,5\text{H}_2\text{O}$  otrzymano w reakcji ligandu HL20 z azotanem(V) erbu(III) (Rysunek 35).[55,56]



Rysunek 35.

W skład otrzymanego kompleksu erbu(III) wchodzi dwie cząsteczki ligandu HL20. Stosunek metal:ligand 1:2 wynika najprawdopodobniej z niewystarczającej liczby oraz układu atomów donorowych w ligandzie HL20. Ligandy  $\text{H}_2\text{L16}$ - $\text{H}_2\text{L19}$  stosowane w syntezie wyżej przedstawionych hydrazonowych związków kompleksowych posiadały wystarczającą ilość oraz odpowiedni układ atomów donorowych, dlatego stosunek metalu:ligandu wynosił 1:1. W ligandzie HL20 układ atomów donorowych jest zaburzony poprzez zastosowanie w reakcji syntezy 2-formylopirydyny, zamiast 2,6-

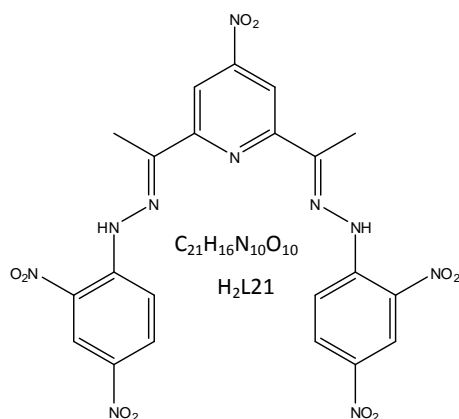
diformylopirydyny. W sferze koordynacyjnej jonu erbu(III) znajdują się dwa  $N_2O$ -donorowe ligandy HL20 i dwa dwufunkcyjne jony azotanowe(V). Jeden jon azotanowy(V) znajduje się w zewnętrznej sferze koordynacyjnej jonu erbu(III). W sieci krystalicznej niekoordynujący jon azotanowy(V) znaleziono w dwóch pozycjach, co zaznaczono na rysunku 36.



Rysunek 36.

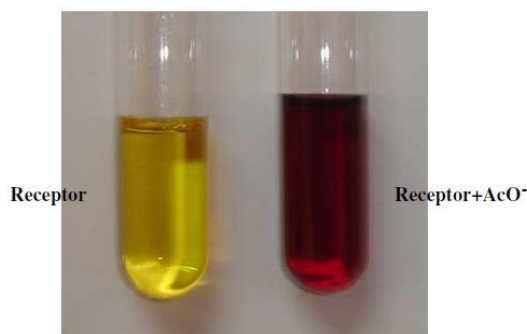
Wiele badań poświęconych jest projektowaniu syntetycznych receptorów (ligandów organicznych) posiadających właściwości wiązania ze sobą pewnego typu anionów. Wiązanie anionów musi polegać jednak na tworzeniu nietrwałych połączeń anion-ligand opartych na wiązaniach wodorowych czy prostych oddziaływaniach kulombowskich kation-anion. Dodatkowo zsyntezowany ligand powinien wykazywać zmiany barwy w zależności od stężenia pewnego anionu. Budowa syntetycznych receptorów wykrywających aniony najczęściej oparta jest na makrocyclicznych ligandach organicznych, których częścią składową są amoniak/guanidyna,[57,58] amidy,[59] mocznik/tiomocznik,[60,61] sfunkcjonalizowane kaliksareny[62] i fenylohydrazony.[63] Szczególnym zainteresowaniem cieszą się syntetyczne receptory oparte na fenylohydrazonach ze względu na możliwość obserwowania zmian barwy - pod wpływem dodania anionu - gołym okiem, bez konieczności korzystania z aparatury spektroskopowej.

Otrzymano hydrazonowy ligand  $H_2L21$  (Rysunek 37) o specyficznych właściwościach. Wykazano, że ligand ten może służyć jako receptor wykrywający pewne aniony.[64]



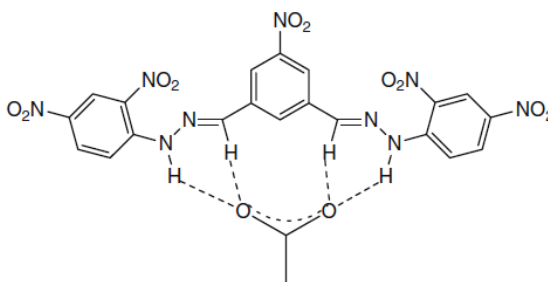
Rysunek 37.

Ligand  $H_2L21$  oddziałuje z anionami octanowymi ( $AcO^-$ ), fluorkowymi ( $F^-$ ) i diwodorofosforanowymi ( $H_2PO_4^-$ ) za pomocą wiązań wodorowych. Oddziaływanie to można zaobserwować gołym okiem poprzez zmianę barwy z żółtej na fioletowo-malinową (Rysunek 38).



Rysunek 38.

Z pomocą spektroskopii UV-vis wykazano, że dodawanie anionu octanowego ( $AcO^-$ ) powoduje zmniejszanie pasma przy wartości 395 nm, a wzrost pasma przy wartości 517 nm (następuje zmiana barwy). Przedstawiono także sposób oddziaływania ligandu  $H_2L21$  z anionem octanowym na podstawie badań protonowego rezonansu magnetycznego i spektroskopii UV-vis (Rysunek 39).



Rysunek 39.

Anion octanowy oddziałuje z ligandem  $H_2L21$  za pomocą wiązań wodorowych tworzących się pomiędzy donorowymi atomami tlenu anionu octanowego a atomami wodoru znajdującymi się przy atomie azotu i karbonylowym atomie węgla. Wyznaczono stałe asocjacji anionów do ligandu  $H_2L21$ .

## 2. Syntetyczne rybonukleazy

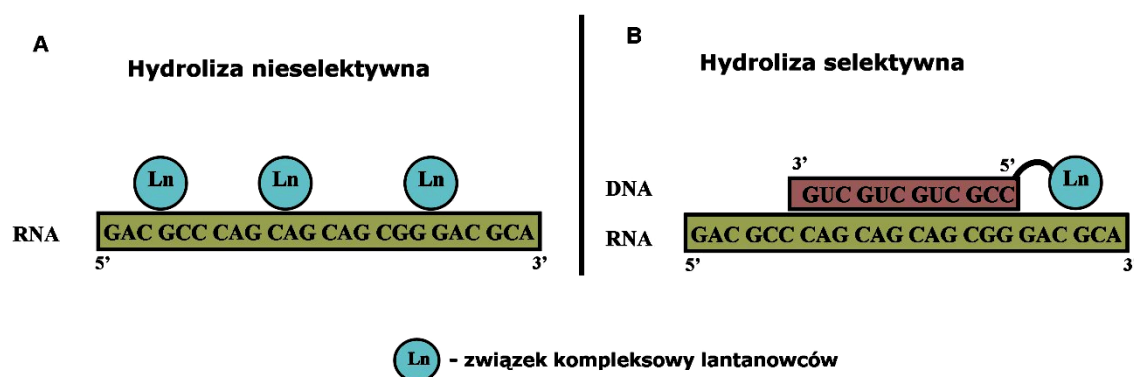
### 2.1 Informacje wstępne

Kwasy nukleinowe, zarówno DNA i RNA, zanim staną się w komórce biologicznie funkcjonalne poddawane są działaniu szeregu enzymów. Pośród nich są nukleazy, które biorą również udział w procesach degradacji RNA i DNA, gdy spełniły one już przypisane im funkcje biologiczne. Specyficzna degradacja kwasów nukleinowych jest także nadzieją na terapeutyczne wykorzystanie RNA czy oligonukleotydów, zarówno poprzez inhibicję procesów ich namnażania, jak i degradację patogennych RNA. Podejścia oparte o antysensowe oligonukleotydy, rybozymy czy specyficzne wyciszanie genów z wykorzystaniem interferencji RNA (RNAi) są powodem uzasadnionego optymizmu na wykorzystanie kwasów nukleinowych w leczeniu szeregu chorób człowieka.[65-67] Od wielu już lat prowadzone są badania nad specyficzną i selektywną degradacją RNA z wykorzystaniem tzw. „sztucznych nukleaz” (ang. *artificial nucleases*). Są to różnego typu związki chemiczne prowadzące do degradacji (hydrolizy) komórkowego RNA w warunkach fizjologicznych. Projektując sztuczne nukleazy zwykle odzwierciedla się sposób działania naturalnych nukleaz z RNA czy DNA. Najczęściej dąży się do odtworzenia oddziaływań z kwasami nukleinowymi, które zapewniają wydajną i selektywną katalityczną hydrolizę określonego wiązania fosfodiesterowego lub przynajmniej pochodzącego z wybranego wąskiego rejonu RNA czy DNA. Kowalencyjne połączenie związku chemicznego zdolnego do hydrolizy RNA czy DNA z oligonukleotydem (zarówno w serii RNA i DNA) o określonej sekwencji sprawia, że dramatycznie wzrasta selektywność katalitycznej hydrolizy docelowego RNA czy DNA. Takie biokonjugaty fragmentem oligonukleotydowym wiążą się z komplementarnym fragmentem kwasu nukleinowego, natomiast przyłączony ligand prowadzi do hydrolizy wiązania diesterowego w przeciwnym fragmencie RNA czy DNA.

Właściwości hydrolityczne jonów metali znane są od lat sześćdziesiątych ubiegłego wieku.[68-70] Wśród nich jony lantanowców zajmują wyjątkową pozycję dzięki możliwości selektywnej i efektywnej hydrolizy wiązań fosfodiesterowych. Jest to spowodowane dużą gęstością elektronową związaną ze stopniem utlenienia, osiąganiem wysokich liczb koordynacyjnych i możliwością szybkiej wymiany ligandów w pozycjach ekwatorialnych.[71] Te cechy charakterystyczne decydują o przydatności jonów i kompleksów lantanowców do konstrukcji syntetycznych rybonukleaz. Dokładne poznanie syntetycznych nukleaz i funkcji jakie mogą odegrać w komórkach organizmów żywych, może ułatwić ich zastosowanie w terapii wielu chorób człowieka.[72]

## 2.2 Metody hydrolizy

Hydrolizę wiązania fosfodiesterowego można prowadzić dwoma metodami. Pierwsza z nich polega na hydrolizie za pomocą kompleksu lantanowca niezwiązanego z RNA, druga zaś na wcześniejszym przyłączeniu kompleksu lantanowca do DNA komplementarnego do określonego fragmentu RNA (Rysunek 40). W pierwszym przypadku hydroliza zachodzi w sposób nieselektywny (Rysunek 40A). Dzięki zmniejszeniu swobody i labilności związku kompleksowego lantanowca poprzez przyłączenie go do DNA, pojawia się możliwość przeprowadzenia sekwencyjnie selektywnej hydrolizy (Rysunek 40B).

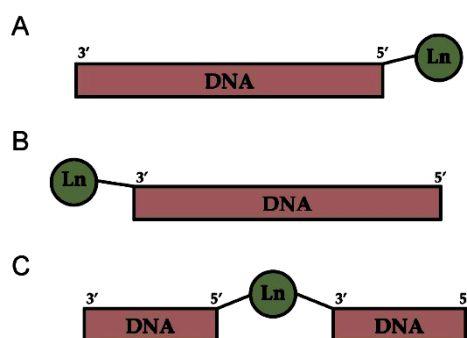


Rodzaje hydrolizy  
Rysunek 23.

Selektywna hydroliza może także zachodzić za pomocą kompleksów lantanowców(III) niezwiązanych z RNA, lecz to wymaga zastosowania specjalnych warunków. Jest ona ściśle związana z budową kompleksu oraz strukturą trzeciorzędową RNA.

## 2.3 Znaczenie miejsca przyłączenia kompleksu lantanowca(III) do łańcucha DNA

Selektywność i efektywność syntetycznych rybonukleaz zależy w dużej mierze od miejsca przyłączenia związku kompleksowego lantanowca do DNA (Rysunek 41).



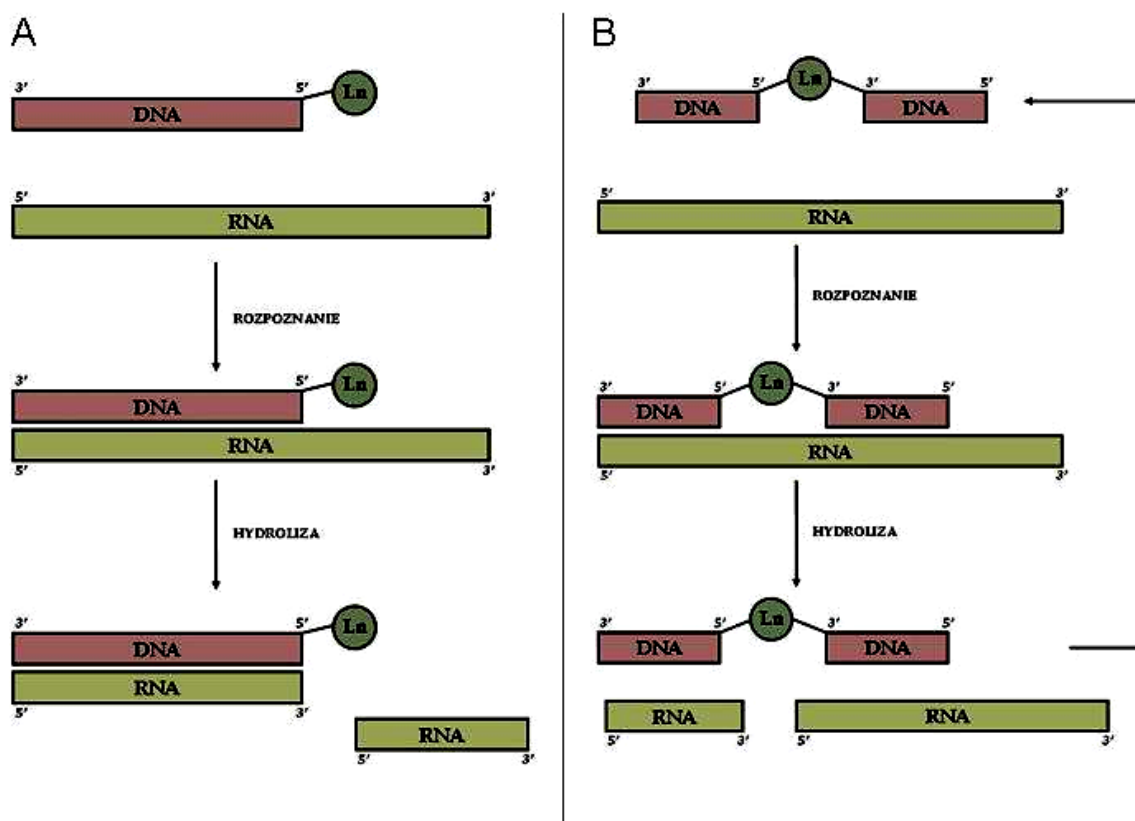
Miejsca przyłączenia kompleksu do DNA: A – 5', B – 3', C – środek łańcucha

Rysunek 41.

Miejsce przyłączenia kompleksu do DNA decyduje o możliwości wielokrotnego użycia syntetycznej rybonukleazy (Rysunek 42).

Pierwsze dwa etapy hydrolizy (rozpoznanie komplementarnego fragmentu RNA przez DNA i hydroliza) są takie same niezależnie od sposobu przyłączenia związku kompleksowego lantanowca do DNA. Różnicę zauważyć można w momencie uwolnienia zhydrolizowanych produktów. W sytuacji, w której kompleks lantanowca przyłączony jest do końca 5', po reakcji hydrolizy uwolnieniu ulega tylko pewien fragment RNA (Rysunek 42A). RNA związany z syntetyczną rybonukleazą (komplementarny fragment DNA wraz ze związkiem kompleksowym)





Efektywność syntetycznej rybonukleazy w zależności od miejsca przyłączenia kompleksu lantanowca do DNA:  
 A – przyłączone do końca 5', działanie jednokrotne, B – przyłączone w środku łańcucha, działanie wielokrotne

Rysunek 42.

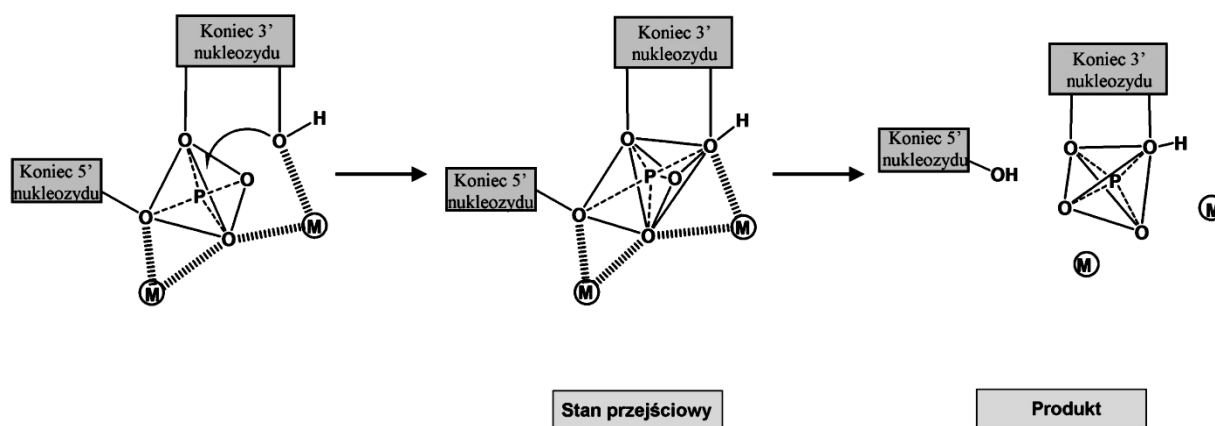
nie zostaje uwolniony, ponieważ wiązania wodorowe pomiędzy komplementarnymi parami zasad nie ulegają rozerwaniu. W sytuacji, w której związek kompleksowy przyłączony jest w środku łańcucha DNA (Rysunek 42B), po reakcji hydrolizy uwolnieniu ulega całkowita ilość RNA, a syntetyczna rybonukleaza może powrócić do pierwszego etapu i dalej prowadzić reakcję hydrolizy następnych nici RNA. Zatem tylko w tym przypadku możliwe jest wielokrotne działanie syntetycznej rybonukleazy.

## 2.4 Mechanizm hydrolizy RNA

Podczas hydrolizy wiązania fosfodiesterowego w RNA jony lantanowców(III) aktywują centra nukleofilowe i elektrofilowe poprzez koordynację (Rysunek 43).[73-75]

Dokonują tego:

- a) zobojętniając ładunek ujemny grupy fosforanowej, tworząc jednocześnie pięciokoordynacyjny produkt przejściowy,
- b) stabilizując stany przejściowe,
- c) obniżając  $pK_a$  cząsteczki wody lub alkoholu,
- d) stabilizując grupę odchodzącą.

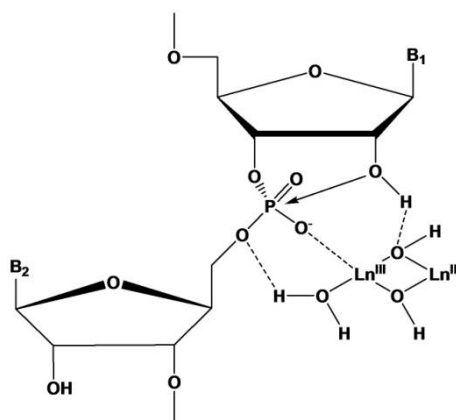


Mechanizm hydrolizy RNA  
Rysunek 43.

Związki kompleksowe lantanowców zachowują się jak katalizatory (kwasy Lewisa) w hydrolizie wiązania P–O, jednak znacznie większą wydajność wykazują kompleksy dwurdzeniowe i wielordzeniowe w porównaniu z monordzeniowymi.[76-78]

Zaproponowany mechanizm hydrolizy RNA przez kompleksy dwurdzeniowe zawierające mostek tlenowy (Rysunek 44) zakłada, że w pierwszym etapie zachodzi koordynacja RNA do klasteru  $[Ln^{3+}_2(OH)_2]^{4+}$ . [70] Następny etap polega na nukleofilowym ataku grupy 2'-hydroksylowej związanej z jonem metalu poprzez wiązanie wodorowe, na atom fosforu (mechanizm może również zakładać bezpośrednią koordynację grupy 2'-hydroksylowej z jonem metalu). Tworzy się produkt przejściowy, w którym atom fosforu ma liczbę koordynacyjną równą 5 i geometrię bipiramidy trygonalnej. Ostatni etap

polega na rozerwaniu wiązania pomiędzy atomem tlenu 5' a atomem fosforu (Rysunek 44).[79]

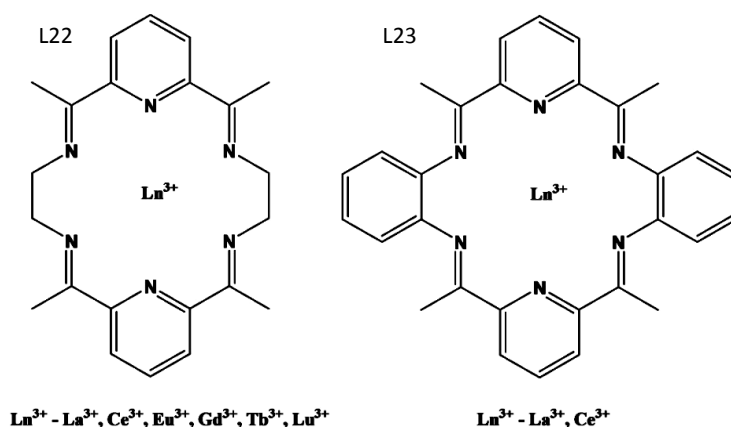


Mechanizm hydrolizy RNA zachodzącej pod wpływem klasteru  $[\text{Ln}^{3+}_2(\text{OH})_2]^{4+}$   
Rysunek 44.

## 2.5 Hydroliza RNA

### 2.5.1 Jony lantanowców(III) i ich kompleksy

Wykazano, że niektóre kompleksy metali są dobrymi katalizatorami reakcji transestryfikacji RNA w warunkach fizjologicznych.[80-83] Wykorzystano kompleksy lantanowców (Rysunek 45) otrzymane przez Radecką-Paryzek, jako pierwsze przykłady skuteczności jonów lantanowców w syntezie N-donorowych makrocyclicznych zasad Schiffa.[84]



N-donorowe makrocycliczne kompleksy lantanowców typu zasad Schiffa  
Rysunek 45.

Stwierdzono, że oprócz właściwości hydrolitycznych kompleksy muszą wykazywać dużą odporność i trwałość podczas prowadzenia reakcji. Warunek ten jest konieczny, gdyż nieskompleksowane jony lantanowców(III) są toksyczne dla organizmów żywych. Zbadano trwałość wybranych związków kompleksowych lutetu(III), europu(III), gadolinu(III), terbu(III) i lantanu(III) zawierających ligand L22.[82] Otrzymane wyniki pozwoliły na wyselekcjonowanie związków kompleksowych trwałych w warunkach hydrolizy. Najtrwalszymi okazały się związki kompleksowe terbu(III), gadolinu(III), lantanu(III) i europu(III), ich stopień rozkładu wynosił odpowiednio 36, 26, 8 i 5%. Kompleks lutetu(III) uległ całkowitemu rozkładowi. Zbadano aktywność hydrolityczną wyselekcjonowanych kompleksów. Hydrolizie poddano dwa fragmenty RNA – ApUp oraz

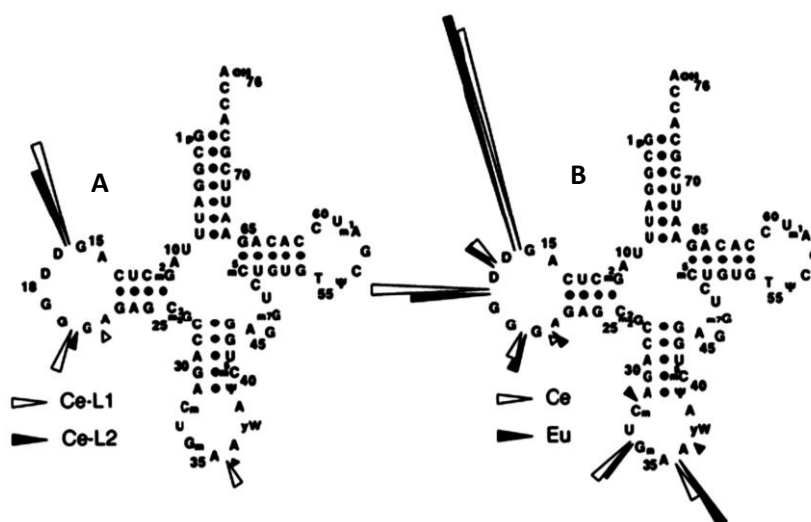
oligoadenylan. Związkiem o największej aktywności hydrolitycznej i trwałości okazał się związek kompleksowy  $\text{Eu}(\text{L22})^{3+}$ . Wysoką aktywność hydrolityczną otrzymano także w przypadku związków kompleksowych  $\text{Gd}(\text{L22})^{3+}$  i  $\text{Tb}(\text{L22})^{3+}$ , jednak ich trwałość była dużo mniejsza w porównaniu z kompleksem  $\text{Eu}(\text{L22})^{3+}$ .

Kompleks	Rozpad kompleksu (%)	Wydajność hydrolizy (%)	
		ApUp	A <sub>12</sub> -A <sub>18</sub>
$\text{La}(\text{L22})^{3+}$	5	20	70
$\text{Eu}(\text{L22})^{3+}$	8	41	89
$\text{Gd}(\text{L22})^{3+}$	26	27	93
$\text{Tb}(\text{L22})^{3+}$	36	57	81
$\text{Lu}(\text{L22})^{3+}$	100	-	-

Jony oraz związki kompleksowe lantanowców(III) mogą hydrolizować RNA w sposób selektywny. Wymaga to jednak zastosowania dodatkowych czynników. Należy zastosować:

- warunki natywne dla struktury RNA,
- dupleks RNA/RNA lub DNA/RNA,
- aktywator.

Zbadano właściwości hydrolityczne związków kompleksowych lantanu(III), ceru(III) i europu(III) typu zasad Schiffa z ligandem L22 i L23 (Rysunek 6). Hydrolizie poddano  $\text{tRNA}^{\text{Phe}}$  z drożdży piwowarskich. Stwierdzono, że związki kompleksowe lantanu(III), ceru(III) i europu(III) z ligandem L22 i L23 hydrolizują  $\text{tRNA}^{\text{Phe}}$  bardziej selektywnie niż nieskompleksowane jony lantanowców.[83] Na rysunku 46 schematycznie przedstawiono miejsce i wydajność hydrolizy  $\text{tRNA}^{\text{Phe}}$  przez kompleks ceru(III) (Rysunek 46A) oraz przez jony ceru(III) i europu(III) (Rysunek 46B).

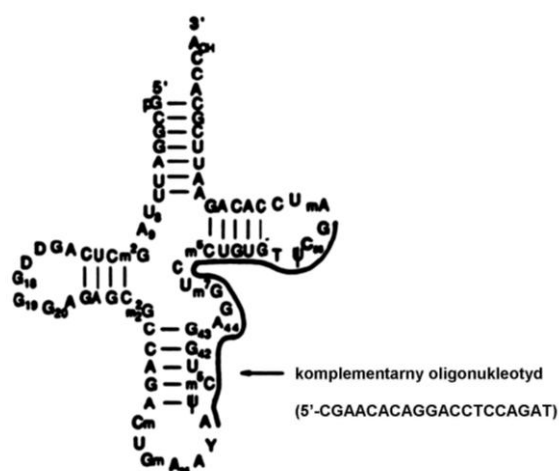


Hydroliza tRNA<sup>Phe</sup> przez kompleks ceru(III) (a) oraz jony ceru(III) i europu(III) (b) (długość strzałek oznacza wydajność hydrolizy)

Rysunek 46.

Wykazano zależność pomiędzy selektywną hydrolizą, a trzeciorzędową strukturą tRNA<sup>Phe</sup>. Struktura trzeciorzędowa tRNA<sup>Phe</sup>, warunkująca hydrolizę w sposób selektywny, jest stabilizowana dzięki obecności jonów Mg<sup>2+</sup>. Zależność ta wynika z zajmowania większej przestrzeni przez jon lantanowca(III) skompleksowany z ligandem (możliwość występowania zawał przestrzennych) oraz właściwości hydrofobowych ligandu.[83]

Wykazano, że związki kompleksowe lantanu(III), europu(III), terbu(III) i gadolinu(III) z ligandem L22 hydrolizują tRNA<sup>Phe</sup> w sposób selektywny.[85] Możliwe to było dzięki wprowadzeniu do środowiska reakcji DNA komplementarnego do fragmentu tRNA. Podwójna nić DNA/tRNA<sup>Phe</sup> utworzyła się pomiędzy 38 a 57 nukleotydem (Rysunek 47).

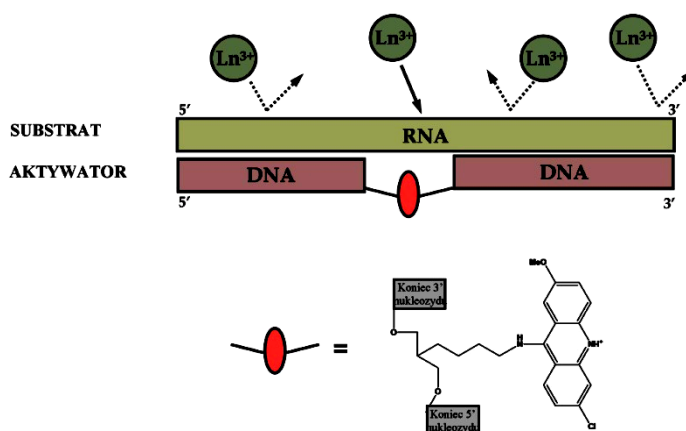


Schematyczny zapis hybrydy DNA/tRNA<sup>Phe</sup>

Rysunek 47.

W trakcie prowadzenia hydrolizy zaobserwowano, że rozpad wiązania P–O zachodził tylko w miejscu, w którym nie tworzyła się hybryda DNA/tRNA<sup>Phe</sup>. Po dłuższym czasie rozpad wiązania fosfodiesterowego zachodził dodatkowo w miejscu nukleozydu A<sub>38</sub>. Wynikiem rozpadu RNA były dwa produkty. Jeden zawierał na końcu 3' cykliczny 2',3'-ester fosforanowy, drugi na końcu 5' grupę 5'-hydroksylową. Hydroliza RNA zachodzi wskutek ataku grupy 2'-hydroksylowej (Rysunek 44) na atom fosforu. Konformacja pojedynczej nici RNA ułatwia ten atak dzięki ustawieniu się grupy 2'-hydroksylowej, atomu fosforu i grupy 5'-hydroksylowej w jednej linii. W podwójnej helisie RNA konformacja reszty rybozy i wiązania diestrowego utrudnia atak grupy 2'-hydroksylowej na centrum fosforanowe według mechanizmu „w linii”. [86,87] Układ w podwójnej helisie DNA/RNA jest podobny do układu podwójnej helisy RNA/RNA, co tłumaczy brak hydrolizy w miejscu tworzenia się hybrydy tRNA<sup>Phe</sup>/DNA. Potwierdzają to badania prowadzone przez Krzyżosiaka nad wpływem struktury tRNA na hydrolizę jonami metali. [88,89]

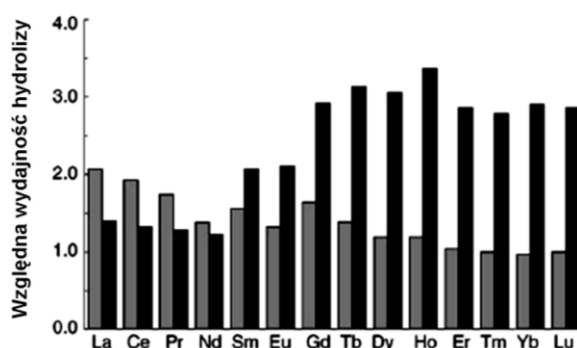
Selektywna hydroliza RNA w obecności jonów lantanowców jest możliwa dzięki zastosowaniu nowej strategii polegającej na niekowalencyjnym łączeniu jonu lantanowca(III) z hydrolizowanym miejscem w RNA za pośrednictwem aktywatora. [90] Hydroliza ta polega na aktywowaniu RNA i jednoczesnym stworzeniu preferowanego miejsca hydrolizy przez jony lantanowców(III) poprzez niekowalencyjne oddziaływanie z komplementarnym oligonukleotydem zawierającym w swej strukturze akrydynę (Rysunek 48). Wydajność hydrolizy prowadzonej przez nieskompleksowane jony lantanowców(III) jest bardzo wysoka.



Schematyczny zapis selektywnej hydrolizy RNA aktywowanej oligonukleotydem zawierającym akrydynę (miejsca selektywnej hydrolizy wskazują strzałki)

Rysunek 48.

Dla porównania przeprowadzono badania, w których w łańcuchu zamiast akrydyny znajdował się tylko łącznik 1,3-propanodiolowy. Okazało się, że reakcje hydrolizy RNA z udziałem jonów lutetu(III), w których zastosowano komplementarny DNA bez akrydyny, przebiegają około 14 razy wolniej w porównaniu z reakcją, w której zastosowano DNA z akrydyną. Wynika z tego, że akrydyna aktywuje selektywną i wydajną hydrolizę wiązań fosfodiesterowych w RNA przez jony lantanowców(III). Pozostałe jony lantanowców również wysoce selektywnie hydrolizują RNA przy użyciu aktywatora akrydynowego. Hydroliza wiązania fosfodiesterowego zachodzi od strony 5' lub 3' niesparowanego nukleozydu i zależy to od zastosowanego jonu lantanowca(III) (Rysunek 49).



Względna wydajność hydrolizy RNA aktywowanej oligonukleotydem zawierającym akrydynę przy zastosowaniu różnych jonów lantanowców (hydroliza od strony 3' – słupki szare, hydroliza od strony 5' – słupki czarne)

Rysunek 49.

Wraz ze wzrostem liczby atomowej wzrasta wydajność hydrolizy od strony 5' niesparowanego nukleozydu (słupki czarne). Natomiast hydroliza zachodząca od strony 3' (słupki szare) niesparowanego nukleozydu jest dużym zaskoczeniem. Hydroliza zachodząca od strony 3' i 5' ostatniego niesparowanego nukleozydu i wzrastająca preferencja hydrolizy od strony 5' wraz ze wzrostem liczby atomowej stwarza kolejną możliwość sterowania hydrolizą RNA poprzez odpowiedni dobór jonu lantanowca(III).

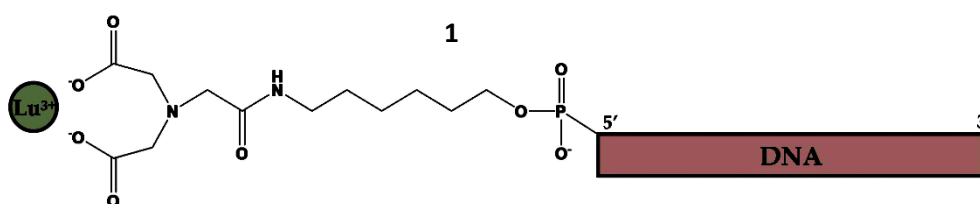
Powyższe badania wskazują, że jony i związki kompleksowe lantanowców(III) typu zasad Schiffa są skutecznymi i selektywnymi katalizatorami reakcji transestryfikacji RNA.[82-90] Nieskompleksowane jony lantanowców odznaczają się mniejszą aktywnością katalityczną bądź mniejszą selektywnością w porównaniu z jonami lantanowców skompleksowanymi z ligandem. Dowiedziono, że właściwości hydrolityczne lantanowców ulegają dużym zmianom wraz ze wzrostem liczby atomowej.



Selektywność hydrolizy w dużej mierze zależy od struktury hydrolizowanego RNA. Wykazano, że trzeciorzędowa struktura tRNA jest stabilizowana jonami  $Mg^{2+}$  i ułatwia selektywną hydrolizę, a podwójna helisa RNA/DNA jest odporna na hydrolityczne działanie jonów i kompleksów lantanowców(III). Dzięki zastosowaniu aktywatorów pojawiła się możliwość prowadzenia selektywnej i wydajnej hydrolizy przez jony lantanowców(III). W tym przypadku jony lantanowców mogą skutecznie zastąpić związki kompleksowe lantanowców uważane wcześniej za bardziej selektywne i wydajne.[90]

### 2.5.2. Kompleksy lantanowców(III) przyłączone do DNA

Wykazano, że sekwencyjnie selektywną hydrolizę wiązania fosfodiesterowego w RNA można przeprowadzić za pomocą kompleksu lantanowca połączonego do końca 5' DNA poprzez łącznik aminoheksylowy (Rysunek 50).[91]



Wzór strukturalny syntetycznej rybonukleazy 1  
Rysunek 50.

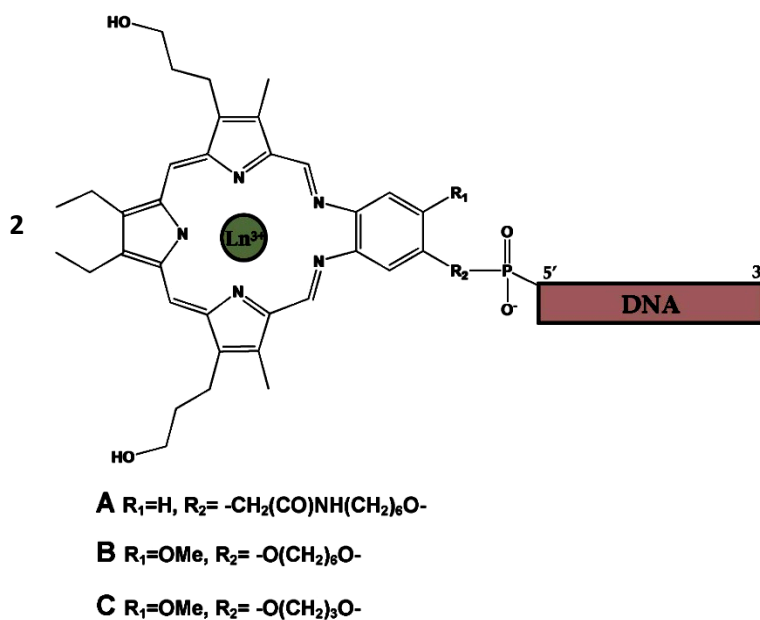
DNA z przyłączonym w pozycji 5' związkiem kompleksowym lutetu **1**, jest komplementarny do określonego fragmentu RNA. Dzięki możliwości tworzenia wiązań wodorowych pomiędzy komplementarnymi parami zasad, hydroliza zachodzi w sposób wysoce selektywny. Rybonukleaza hydrolizuje RNA dokładnie w jednym miejscu, na końcu 3' ostatniego sparowanego rybonukleotydu. Wydajność hydrolizy przy zastosowaniu jonów lutetu(III), tulu(III) i europu (III) były podobne i wyniosła około 17%. Natomiast zastosowanie jonów lantanu(III) spowodowało obniżenie wydajności hydrolizy do około 8%.

Ligandy zawierające aniony karboksylowe (Rysunek 50) wykazują duże powinowactwo do jonów lantanowców ze względu na obecność atomów tlenu, jednocześnie jednak

obniżają ich aktywność katalityczną, co spowodowane jest ujemnym ładunkiem grup karboksylowych.[92]

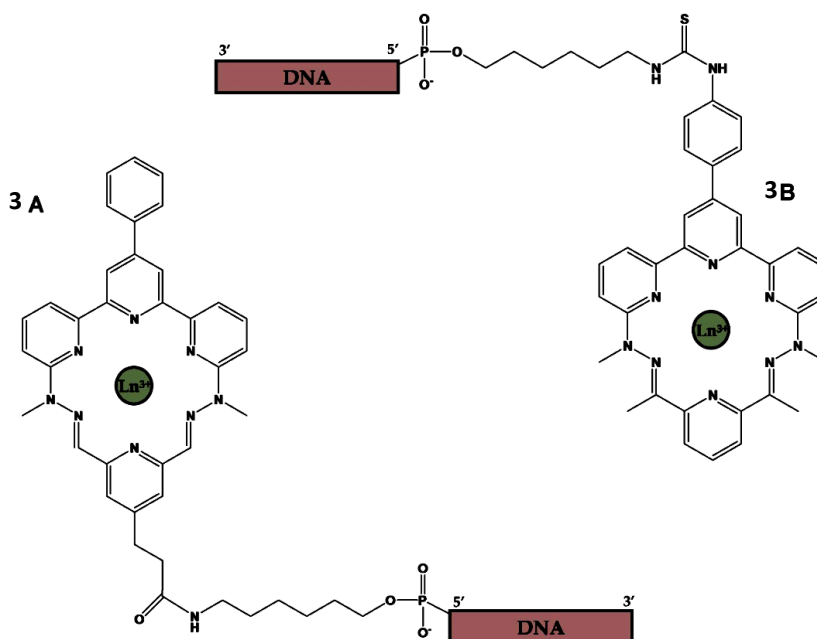
Negatywny wpływ jonów karboksylowych na wydajność hydrolizy oraz wysoka aktywność katalityczna kompleksów lantanowców z ligandami typu zasad Schiffa stały się impulsem do poszukiwania skuteczniejszych kompleksów lantanowców z nowymi ligandami.

Zaproponowano nowy sposób wiązania jonów lantanowców(III) do DNA przy wykorzystaniu kompleksów makrocyklicznych wywodzących się z porfiryny (Rysunek 51) oraz pirydyny i cyklofanu (Rysunek 52).[93-98] Najwyższą wydajność hydrolizy wynoszącą 50% otrzymano w przypadku zastosowania jonów dysprozu(III) w syntetycznej rybonukleazie **2C** (Rysunek 51). Miejsce, w którym zachodzi hydroliza, to pierwszy niesparowany nukleotyd przy końcu 3'. Podobny wynik można zaobserwować przy zastosowaniu tego samego jonu w syntetycznych rybonukleazach **2A** i **2B**. Wymiana jonu dysprozu(III) na jony europu(III) powoduje obniżenie wydajności hydrolizy z 50 do 30%.



Wzór strukturalny syntetycznych rybonukleaz 2A, B i C  
Rysunek 51.

Syntetyczne rybonukleazy **3A** i **3B** (Rysunek 52) zawierające jon europu(III) odznaczają się podobną aktywnością katalityczną jak nukleaza **2C**, a ich wydajność hydrolityczna wynosi odpowiednio 88 i 51%.

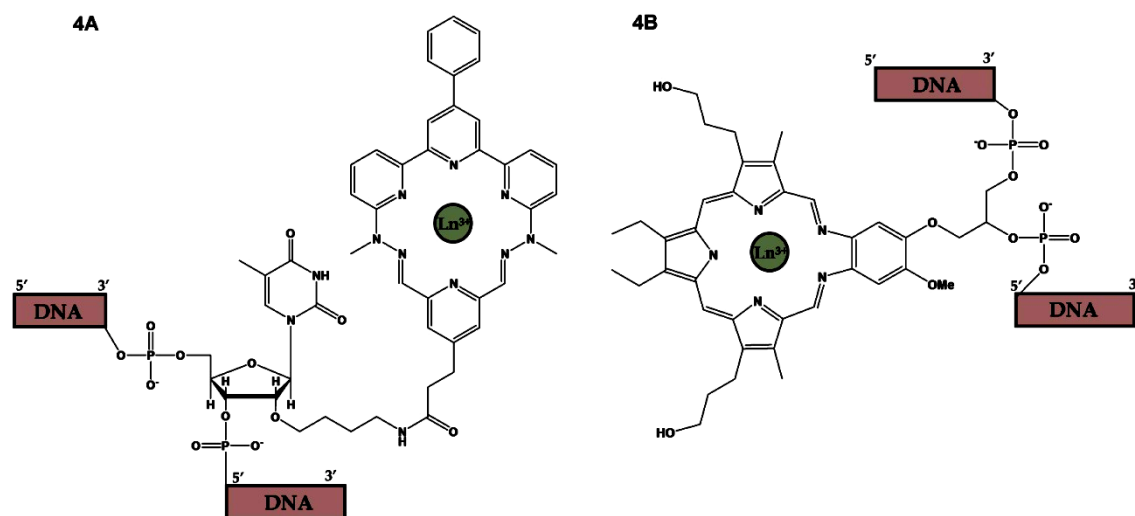


Wzory strukturalne syntetycznych rybonukleaz 3A i B  
Rysunek 52.

Rozpad wiązania fosfodiesterowego przy zastosowaniu nukleaz **2A**, **2B**, **3A** i **3B** zachodzi po stronie 3' trzeciego nukleotydu licząc od ostatniej sparowanej pary zasad. Różnica pomiędzy nukleazami **2A**, **2B**, **3A**, **3B** a **2C** dotycząca miejsca hydrolizy zależy od długości aminołącznika zastosowanego do przyłączenia związku kompleksowego. W przypadku nukleaz **2C** łącznik ma trzy grupy metylenowe, natomiast nukleazy **2A**, **2B**, **3A** i **3B** zawierają w łączniku sześć grup metylenowych. Znalezienie i zastosowanie łączników o odpowiedniej długości pozwala na sterowanie syntetyczną rybonukleazą przez prowadzenie hydrolizy w różnych odległościach licząc od ostatniego sparowanego nukleozydu. Zmiana łącznika nie wpływa jednak na zmianę miejsca hydrolizy w wiązaniu fosfodiesterowym, która zachodzi zawsze od strony 3' ostatniego sparowanego nukleozydu.

Związki kompleksowe lantanowców przyłączone do środka łańcucha DNA komplementarnego do całego łańcucha RNA **4A** i **4B** (Rysunek 53) są dużo lepszymi rybonukleazami ze względu na możliwość kilkukrotnego wykorzystania ich w reakcji hydrolizy (Rysunek 42). Niestety, wydajności hydrolizy są około 2-3 rzędy wielkości niższe

niż dla nukleaz, w których kompleksy lantanowców przyłączono do końca 5'. [99,100]



Wzory strukturalne syntetycznych rybonukleaz 4A i B  
Rysunek 53.

Wydajność hydrolizy nukleaz **4A** i **4B** zależy od miejsca, w którym znajdzie się związek kompleksowy po utworzeniu wiązań pomiędzy komplementarnymi parami zasad. Jeżeli związek kompleksowy znajduje się w małym rowku podwójnej helisy DNA/RNA, to reakcja hydrolizy zachodzi wydajniej niż w przypadku gdy znajdowałby się w rowku dużym.

## 2.6 PODSUMOWANIE

W powyższym rozdziale starano się przybliżyć tematykę dotyczącą hydrolizy wiązania fosfodiesterowego w RNA za pomocą jonów i związków kompleksowych lantanowców, które mogą spełniać rolę syntetycznych rybonukleaz oraz wskazanie na czynniki, które wpływają na ich efektywność i selektywność. Przy syntezie potencjalnych syntetycznych rybonukleaz należy zwrócić uwagę na:

- dobór odpowiedniego jonu lantanowca,
- dobór odpowiedniego ligandu, z którym jon lantanowca jest kompleksowany,
- miejsce przyłączenia związku kompleksowego do DNA,
- odpowiedni dobór warunków hydrolizy,

e) trwałość kompleksu lantanowca w warunkach hydrolizy.

Wykazano, że jony lantanowców wraz ze wzrostem liczby atomowej preferują hydrolizę wiązania fosfodiesterowego od strony 5'. Największą aktywnością hydrolityczną (od strony 5') odznaczają się jony lantanowców począwszy od gadolinu(III) do lutetu(III). Uwzględniając jednak trwałość związków kompleksowych, najlepszą trwałością odznaczają się kompleksy lantanowców od lantanu(III) do terbu(III). Wynika stąd, że najlepszymi jonami nadającymi się do hydrolizy RNA powinny być jony gadolinu(III), terbu(III) i dysprozu(III). Dodatkowo wykazano, że najlepszą aktywność hydrolityczną wykazują kompleksy zawierające w swej strukturze dwa i więcej jonów lantanowców.

Dobierając ligand należy zwrócić uwagę na możliwość deprotonacji lub protonacji ligandu. Występowanie ligandu w formie deprotonowanej (np. w przypadku grup karboksylowych) obniża zdolność hydrolityczną jonów lantanowców.

Miejsce łączenia kompleksu lantanowca z DNA jest niezwykle ważne, gdyż decyduje o możliwości wielokrotnego wykorzystania syntetycznej rybonukleazy w cyklu katalitycznym.

Możliwość zastosowania w przyszłości syntetycznych rybonukleaz zawierających jony lantanowców np. w leczeniu chorób genetycznych, związana jest z zapewnieniem ich nietoksyczności dla organizmu żywego oraz doprowadzeniem do sytuacji, w której niewielka ilość syntetycznej rybonukleazy pozwoli na naprawę zmutowanego fragmentu genu. Wymaga to dogłębnego poznania sposobu działania syntetycznych rybonukleaz zawierających jony lantanowców oraz znalezienia sposobu ich usuwania ze szlaku metabolicznego.

## IV. CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA

### 1. Metody charakterystyki ligandów i związków kompleksowych

Widma spektroskopii w podczerwieni (IR) rejestrowano na aparacie FT-IR Bruker IFS 66v/S w postaci tabletek KBr.

Widma protonowego rezonansu magnetycznego ( $^1\text{H}$ -NMR) wykonano na aparacie Varian Gemini 300 MHz stosując jako wzorzec wewnętrzny tetrametylosilan. Widma wykonano w deuterowanych rozpuszczalnikach: dimetylosulfotlenku ( $\text{DMSO-}d_6$ ) oraz chloroformie ( $\text{CDCl}_3$ ).

Widma spektrometrii masowej (ESI-MS) wykonano na aparacie Waters/Micromass ZQ ES stosując jako rozpuszczalnik: metanol, etanol, acetonitryl i wodę.

Analizę elementarną (AE) wykonano na aparacie Vario EL III firmy Elementar.

Analizę termograwimetryczną (TG) wykonano na aparacie SetSys 12 firmy Setaram.

Temperaturę topnienia wyznaczono na aparacie EZ-Melt firmy Stanford Research Systems.

## **2. Metody charakterystyki prekursorów syntetycznych rybonukleaz oraz oligonukleotydów**

Widma spektroskopii masowej ESI i MALDI wykonano na aparatach Waters/Micromass ZQ ES i MALDI TOF (model Autoflex, Bruker).

Stężenia roztworów badano za pomocą spektroskopii UV-vis na aparacie PICO-drop.

Widma  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{31}\text{P}$ -NMR wykonano na aparacie Varian Unity 300 MHz oraz Ultrashield 400plus 400 MHz.

### 3. Synteza związków kompleksowych lantanowców

#### Zastosowane sole metali:

Stosowane sześciowodne sole azotanowe(V) i chlorkowe lantanowców(III)  $\text{Ln}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  i  $\text{LnCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  otrzymano wg poniższej procedury.

Zwilżony wodą destylowaną tlenek lantanowca(III) (1g) rozpuszczono na gorąco w rozcieńczonym kwasie azotowym(V) lub solnym. Następnie roztwory powoli zagęszczono i kilkakrotnie przemyto wodą destylowaną, kontrolując pH za pomocą papierka uniwersalnego, aż do uzyskania odczynu obojętnego. Otrzymaną sól suszono w eksykatorze nad NaOH. Sole zidentyfikowano za pomocą spektroskopii masowej ESI-MS.

#### Zastosowane związki organiczne:

Zastosowano dostępne handlowo związki: aldehyd salicylowy, 2,6-diacetylopirydynę, 1,12-diamino-4,9-dioksadodekan, 2-metylo-1,5-diaminopentan, 2-aminobenzoilohydrazyd, bezwodnik kwasu ftalowego, kwas *O*-acetylosalicylowy, chlorek *O*-acetylosalicylowy, dimetyloamina, metyloamina, dicykloheksylokarboimid, 4-dimetyloaminopirydyna, bis(*N,N*-diizopropyl)-2-cyjanoetyloamidofosforyn, *N*-hydroksyimid kwasu bursztynowego.

#### Rozpuszczalniki:

W przeprowadzonych eksperymentach zastosowano następujące rozpuszczalniki: metanol, etanol, THF, chlorek metylenu, chloroform, eter dietylowy, acetonitryl, DMF.



### 3.1 Synteza związków kompleksowych lantanowców(III) zawierających *N,N'*-bis(salicylideno)-1,12-diamino-4,9-dioksadodekan – ligand $H_2L^1$

Związki kompleksowe lantanowców(III) zawierające zasadę Schiffa *N,N'*-bis(salicylideno)-1,12-diamino-4,9-dioksadodekan (ligand  $H_2L^1$ ) otrzymano metodą templatową w jednoetapowej reakcji kondensacji dwóch cząsteczek aldehydu salicylowego i jednej cząsteczki 1,12-diamino-4,9-dioksadodekanu w obecności azotanowych(V) soli lantanowców.

#### Synteza związków kompleksowych lantanu(III), prazeodymu(III), neodymu(III) i europu(III) (I, II, III i V)

Do kolby zawierającej roztwór azotanu(V) lantanu(III), prazeodymu(III), neodymu(III) lub europu(III) (0,1 mmol) w metanolu (10 ml) wprowadzono roztwór aldehydu salicylowego (0,2 mmol) w metanolu (10 ml), następnie wkraplano (~20-30 minut) roztwór 4,9-dioksa-1,12-diaminododekanu (0,1 mmol) w metanolu (10 ml). Zaobserwowano zmianę barwy na żółtą. Reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej na mieszadle magnetycznym przez 24 godziny. Mieszaninę reakcyjną zatężono na wyparce do około 1/3 objętości i dodano ~3ml eteru dietylowego, wytrącił się osad, który odwirowano, przemyto dwukrotnie eterem dietylowym i wysuszono na powietrzu. Osad zbadano metodami analitycznymi (analiza elementarna, analiza termogravimetryczna) i spektralnymi (spektrometria mas ESI, spektroskopia w podczerwieni). Wydajność reakcji: 17,8% (I); 58,5% (II); 39,3% (III); 47,8% (V). Temperatura topnienia: 243,3°C (I); 232,8°C (II); 249,1°C (III); 245,5°C (V).

#### Synteza związku kompleksowego samaru(III) (IV)

Do kolby zawierającej roztwór azotanu(V) samaru(III) w metanolu (15 ml) wprowadzono roztwór aldehydu salicylowego (0,2 mmol) w metanolu (15 ml), następnie wkraplano (~20-30 minut) roztwór 4,9-dioksa-1,12-diaminododekanu (0,1 mmol) w

metanolu (10 ml). Zaobserwowano zmianę barwy na żółtą. Reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej na mieszadle magnetycznym przez 24 godziny. Mieszaninę reakcyjną zatężono na wyparce do około 10 ml, wytrącił się żółty osad, który odwirowano, przemyto dwukrotnie eterem dietylowym i wysuszono na powietrzu. Osad zbadano metodami analitycznymi (analiza elementarna, analiza termogravimetryczna) i spektralnymi (spektrometria mas ESI, spektroskopia w podczerwieni). Wydajność reakcji: 17,4%. Temperatura topnienia: 256,9°C.

### **Synteza związku kompleksowego gadolinu(III) (VI)**

Do kolby zawierającej roztwór azotanu(V) gadolinu(III) (0,1 mmol) w metanolu (10 ml) wprowadzono roztwór aldehydu salicylowego (0,2 mmol) w metanolu (10 ml), następnie wkraplano (~20-30 minut) roztwór 4,9-dioksa-1,12-diaminododekanu (0,1 mmol) w metanolu (10 ml). Zaobserwowano zmianę barwy na żółtą. Po około 5 minutach od wkroplenia całkowitej ilości diaminy pojawiło się zmętnienie. Dodano 10 ml metanolu. Reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej na mieszadle magnetycznym przez 24 godziny. Z mieszaniny reakcyjnej wypadł żółty osad, który odwirowano, przemyto dwukrotnie eterem dietylowym i wysuszono na powietrzu. Osad zbadano metodami analitycznymi (analiza elementarna, analiza termogravimetryczna) i spektralnymi (spektrometria mas ESI, spektroskopia w podczerwieni). Wydajność reakcji: 47,4%. Temperatura topnienia: 251,2°C.

### **Synteza związków kompleksowych dysprozu(III), holmu(III), erbu(III) i tulu(III). (VII-X)**

Do kolby zawierającej roztwór azotanu(V) dysprozu(III), holmu(III), erbu(III) lub tulu(III) (0,1 mmol) w metanolu (15 ml) wprowadzono roztwór aldehydu salicylowego (0,2 mmol) w metanolu (15 ml), następnie wkraplano (20-30 minut) roztwór 4,9-dioksa-1,12-diaminododekanu (0,1 mmol) w metanolu (10 ml). Zaobserwowano zmianę barwy na żółtą. Reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej na mieszadle magnetycznym przez 24 godziny. Mieszaninę reakcyjną zatężono na wyparce do około 3-5 ml, wytrącił się osad, który odwirowano, przemyto dwukrotnie eterem dietylowym i wysuszono na

powietrzu. Osad zbadano metodami analitycznymi (analiza elementarna, analiza termogravimetryczna) i spektralnymi (spektrometria mas ESI, spektroskopia w podczerwieni). Wydajność reakcji: 48,7% (VII); 62,0% (VIII); 57,7% (IX); 24,7% (X). Temperatura topnienia: 240,1 °C (VII); 238,9 °C (VIII); 257,5 °C (IX), 247,5 °C (X).

### **Synteza związku kompleksowego lantanu(III) (XI)**

Do kolby zawierającej roztwór azotanu(V) lantanu(III) (0,1 mmol) w metanolu (15 ml) wprowadzono roztwór aldehydu salicylowego (0,2 mmol) w metanolu (15 ml), następnie wkraplano (~30 minut) roztwór 4,9-dioksa-1,12-diaminododekanu (0,1 mmol) w metanolu (20 ml). Zaobserwowano zmianę barwy na żółtą. Reakcję prowadzono w temperaturze 50 °C pod chłodnicą zwrotną, na mieszadle magnetycznym przez 24 godziny. Mieszaninę reakcyjną zatężono na wyparce do ok. 5 ml i dodano ~3 ml eteru dietylowego, wytrącił się osad, który odwirowano, przemyto dwukrotnie eterem dietylowym i wysuszono na powietrzu. Przesącz pozostawiono do dalszej analizy. Po odparowaniu rozpuszczalnika uzyskano żółty osad, który przemyto dwukrotnie eterem dietylowym i wysuszono na powietrzu. Osad zbadano metodami analitycznymi (analiza elementarna, analiza termogravimetryczna) i spektralnymi (spektrometria mas ESI, spektroskopia w podczerwieni). Wydajność reakcji: 44,4%. Temperatura topnienia: 229,4 °C.

### **Synteza związku kompleksowego europu(III) (XII)**

Do kolby zawierającej roztwór azotanu(V) europu(III) (0,1 mmol) w metanolu (15 ml) wprowadzono roztwór aldehydu salicylowego (0,2 mmol) w metanolu (15 ml), następnie wkraplano (~30 minut) roztwór 4,9-dioksa-1,12-diaminododekanu (0,1 mmol) w metanolu (10 ml). Zaobserwowano zmianę barwy na żółtą. Reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej na mieszadle magnetycznym. Po wkropleniu całej ilości diaminy z mieszaniny reakcyjnej wypadł żółty osad, który odwirowano, przemyto dwukrotnie eterem dietylowym i wysuszono na powietrzu. Osad zbadano metodami analitycznymi

(analiza elementarna, analiza termograwimetryczna) i spektralnymi (spektrometria mas ESI, spektroskopia w podczerwieni). Wydajność reakcji: 47,8%. Temperatura topnienia: 239,7°C.

### **Synteza związków kompleksowych dysprozu(III), holmu(III) (XIII, XIV)**

Do kolby zawierającej roztwór azotanu(V) dysprozu(III) lub holmu(III) (0,2 mmol) w metanolu (10 ml) wprowadzono roztwór aldehydu salicylowego (0,6 mmol) w metanolu (10 ml), następnie wkraplano (~20-30 minut) roztwór 4,9-dioksa-1,12-diaminododekanu (0,3 mmol) w metanolu (10 ml). Zaobserwowano zmianę barwy na żółtą. Reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej na mieszadle magnetycznym przez 24 godziny. Mieszaninę reakcyjną zatężono na wyparce do ok. 5 ml, dodano 3 ml eteru dietylowego, wypadł żółty osad, który odwirowano, przemyto dwukrotnie eterem dietylowym i wysuszono na powietrzu. Osad zbadano metodami analitycznymi (analiza elementarna, analiza termograwimetryczna) i spektralnymi (spektrometria mas ESI, spektroskopia w podczerwieni). Wydajność reakcji: 19,0% (XIII); 13,9% (XIV). Temperatura topnienia: 235,5°C (XIII); 234,8°C (XIV).

### 3.2 Synteza związków kompleksowych lantanowców(III) zawierających *N,N'*-bis(salicylideno)-1,5-diamino-2-metylopentan – ligand $H_2L^2$

Związki kompleksowe lantanowców(III) zawierające zasadę Schiffa *N,N'*-bis(salicylideno)-1,5-diamino-2-metylopentan (ligand  $H_2L^2$ ) otrzymano metodą templatową, w jednoetapowej reakcji kondensacji dwóch cząsteczek aldehydu salicylowego i jednej cząsteczki 1,5-diamino-2-metylopentanu w obecności azotanów(V) lantanowców(III).

#### Synteza związku kompleksowego lantanu(III). (XV)

Do kolby zawierającej roztwór azotanu(V) lantanu(III) (0,1 mmol) w metanolu (20 ml) wprowadzono roztwór aldehydu salicylowego (0,2 mmol) w metanolu (20 ml), następnie wkraplano (~20 minut) roztwór 2-metylo-1,5-diaminopentanu (0,1 mmol) w metanolu (20 ml). Zaobserwowano zmianę barwy na żółtą. Reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej na mieszadle magnetycznym przez 24 godziny. Mieszaninę reakcyjną zatężono na wyparce do ok. 10 ml, dodano 5 ml eteru dietylowego, wypadł żółty osad, który odwirowano, przemyto dwukrotnie eterem dietylowym i wysuszono na powietrzu. Osad zbadano metodami analitycznymi (analiza elementarna, analiza termogravimetryczna) i spektralnymi (spektrometria mas ESI, spektroskopia w podczerwieni). Wydajność reakcji: 55,0%. Temperatura topnienia: 246,3°C.

#### Synteza związków kompleksowych prazeodymu(III), neodymu(III), erbu(III) i iterbu(III) (XVI, XVII, XXI i XXII)

Do kolby zawierającej roztwór azotanu(V) prazeodymu(III), neodymu(III), erbu(III) lub iterbu(III) (0,1 mmol) w etanolu (10 ml) wprowadzono roztwór aldehydu salicylowego (0,2 mmol) w etanolu (10 ml), następnie wkraplano (~30 minut) roztwór 2-

metylo-1,5-diaminopentanu (0,1 mmol) w etanolu (10 ml). Zaobserwowano zmianę barwy na żółtą. Reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej na mieszadle magnetycznym przez 30 minut. Po 30 minutach z mieszaniny reakcyjnej wypadły żółte osady, które odwirowano, przemyto dwukrotnie eterem dietylowym i wysuszono na powietrzu. Osad zbadano metodami analitycznymi (analiza elementarna, analiza termograwimetryczna) i spektralnymi (spektrometria mas ESI, spektroskopia w podczerwieni). Wydajności reakcji: 50,9% (XVI); 40,8% (XVII); 32,0% (XXI); 26,1% (XXII). Temperatura topnienia: 256,6°C (XVI); 255,3°C (XVII); 262,2°C (XXI); 254,1°C (XXII).

### **Synteza związków kompleksowych samaru(III), dysprozu(III) i holmu(III) (XVIII-XX)**

Do kolby zawierającej roztwór azotanu(V) samaru(III), dysprozu(III) lub holmu(III) (0,1 mmol) w metanol/chloroform (1:1) (10 ml) wprowadzono roztwór aldehydu salicylowego (0,2 mmol) w metanol/chloroform (1:1) (10 ml), następnie wkraplano (~30 minut) roztwór 2-metylo-1,5-diaminopentanu (0,1 mmol) metanol/chloroform (1:1) (10 ml). Zaobserwowano zmianę barwy na żółtą. Reakcję prowadzono w temperaturze 50°C pod chłodnicą zwrotną, na mieszadle magnetycznym przez 24 godziny. Mieszaninę reakcyjną zatężono na wyparce do ok. 5ml. Podczas zatężania wypadły żółte osady, które odwirowano, przemyto dwukrotnie eterem dietylowym i wysuszono na powietrzu. Osad zbadano metodami analitycznymi (analiza elementarna, analiza termograwimetryczna) i spektralnymi (spektrometria mas ESI, spektroskopia w podczerwieni). Wydajności reakcji: 31,9% (XVIII); 40,5% (XIX) i 31,5% (XX). Temperatura topnienia: 240,8°C (XVIII); 248,8°C (XIX) i 241,7°C (XX).

### 3.3 Synteza związków kompleksowych lantanowców(III) zawierających 2,6-diacetylopirydyno-bis(2-aminobenzoilohydrazon) – ligand $L^3$ i 2,6-diacetylopirydyno-(2-aminobenzoilohydrazon) – ligand $L^4$

#### 3.3.1 Metoda templatowa

Związki kompleksowe zawierające 2,6-diacetylopirydyno-bis(2-aminobenzoilohydrazon) (ligand  $L^3$ ) otrzymano metodą templatową w jednoetapowej reakcji kondensacji dwóch cząsteczek 2-aminobenzoilohydrazynu i jednej cząsteczki 2,6-diacetylopirydyny w obecności odpowiednich soli lantanowców.

**Związki kompleksowe zawierające 2,6-diacetylopirydyno-bis(2-aminobenzoilohydrazon) ( $L^3$ ) otrzymane w obecności azotanów(V) lantanowców(III) (XXIII-XXXIV)**

Do kolby zawierającej 2,6-diacetylopirydynę (0,1 mmol) i odpowiednią sól lantanowca (0,1 mmol) w metanolu (20 ml), wprowadzono w jednej porcji 2-aminobenzoilohydrazyn (0,2 mmol) w metanolu (10 ml). Reakcje prowadzono przez 24 godziny w temperaturze pokojowej. Po około 24 lub 72 godzinach z mieszaniny reakcyjnej wypadały osady lub kryształy. W przypadku każdej reakcji przeprowadzono próby krystalizacji metodą dyfuzji:

I cykloheksan

II THF

III chlorek metylenu

Osady zbadano metodami analitycznymi (analiza elementarna) i spektralnymi (spektrometria mas ESI, spektroskopia w podczerwieni). Wydajność reakcji: 76,5% (XXIII); 37,4% (XXIV); 73,5% (XXV); 75,5% (XXVI); 78,5% (XXVII); 86,4% (XXVIII); 80,7% (XXIX); 45,6% (XXX); 53,9% (XXXI); 64,2% (XXXII); 63,2% (XXXIII); 67,3% (XXXIV).

**Związki kompleksowe zawierające 2,6-diacetylopirydyno-bis(2-aminobenzoilohydrazon) ( $L^3$ ) otrzymane w obecności chlorków lantanowców(III) (XXXV-XLI)**

Do kolby zawierającej 2,6-diacetylopirydynę (0,1 mmol) i odpowiednią chlorkową sól lantanowca (0,1 mmol) w metanolu (20 ml), wprowadzono w jednej porcji 2-aminobenzoilohydrazyd (0,2 mmol) w metanolu (10 ml). Reakcje prowadzono przez 24 godziny w temperaturze pokojowej. Po 24 godzinach mieszaninę reakcyjną zatężono na wyparce rotacyjnej do około 2 ml i pozostawiono do powolnego odparowania. Po około 24 lub 72 godzinach z mieszaniny reakcyjnej wypadały osady lub kryształy. W przypadku każdej reakcji przeprowadzono próby krystalizacji metodą dyfuzji:

I cykloheksan

II THF

III chlorek metylenu

Osady zbadano metodami analitycznymi (analiza elementarna) i spektralnymi (spektrometria mas ESI, spektroskopia w podczerwieni). Wydajność reakcji: 55,2% (XXXV); 58,2% (XXXVI); 78,3% (XXXVII); 96,9% (XXXVIII); 77,8% (XXXIX); 83,7% (XL) i 92,3% (XLI)

### 3.3.2 Metoda bezpośrednia

Kompleksy lantanowców(III) zawierające zasady Schiffa wywodzące się z 2,6-diacetylopirydyny i 2-aminobenzoilohydrazidu otrzymano także metodą bezpośrednią. W pierwszym etapie podjęto próby otrzymania ligandu  $L^3$ , który jest produktem kondensacji dwóch cząsteczek 2-aminobenzoilohydrazidu i jednej cząsteczki 2,6-diacetylopirydyny. Okazało się, że izoluje się dwa produkty reakcji, z których jednym jest 2,6-diacetylopirydyno-bis(2-aminobenzoilohydrazon) ligand  $L^3$ , a drugim 2,6-diacetylopirydyno-(2-aminobenzoilohydrazon)  $L^4$ , produkt kondensacji jednej cząsteczki 2-aminobenzoilohydrazidu z jedną cząsteczką 2,6-acetylopirydyny.



### 3.3.2.1 Synteza ligandów

#### Synteza 2,6-diacetylopirydyno-bis(2-aminobenzoilohydrazonu) – ligandu $L^3$ i 2,6-diacetylopirydyno(2-aminobenzoilohydrazonu) – ligandu $L^4$

Ligandy syntezowano na podstawie znanej procedury z kilkoma modyfikacjami.[101]

Do roztworu 2,6-diacetylopirydyny (20 mmol) w 50 ml etanolu dodano wkraplając 50 ml gorącego roztworu 2-aminobenzoilohydrazynu (40 mmol) w etanolu. Po wkropleniu całej ilości 2-aminobenzoilohydrazynu reakcję prowadzono przez 6 godzin w temperaturze wrzenia etanolu pod chłodnicą zwrotną i na mieszadle magnetycznym. Mieszaninę reakcyjną pozostawiono do powolnego ochłodzenia przez noc. Uzyskano drobnokrystaliczny, jasnożółty osad, który jest mieszaniną ligandów  $L^3$  i  $L^4$ . Produkty oczyszczono poprzez podwójną rekrytalizację z metanolu. Czystość sprawdzono za pomocą chromatografii cienkowarstwowej TLC i  $^1\text{H-NMR}$ . (Próby uzyskania kryształów w celu zbadania ich za pomocą dyfrakcji promieni RTG nie przyniosły pozytywnych rezultatów.) Wydajność: 13,9% dla ligandu  $L^3$ ; 85,5% dla ligandu  $L^4$ . Wykonano widmo  $^1\text{H-NMR}$  i COSY

$^1\text{H-NMR}$  (DMSO)

$L^3$

$\delta$  10,66 (2H, s, **6**); 8,07 (2H, d, **8**); 7,92 (1H, t, **9**); 7,59 (2H, d, **5**); 7,22 (2H, t, **4**); 6,79 (2H, d, **2**); 6,61 (2H, t, **3**); 6,25 (4H, s, **1**); 2,52 (6H, s, **7**),

$L^4$

$\delta$  10,71 (1H, s, **6**); 8,30 (1H, d, **8**); 8,05 (1H, t, **9**); 7,97 (1H, d, **10**); 7,59 (1H, d, **5**); 7,23 (1H, t, **4**); 6,79 (1H, d, **2**); 6,61 (1H, t, **3**); 6,25 (2H, br s, **1**); 2,71 (3H, s, **11**); 2,54 (3H, s, **7**)

### 3.3.2.2 Synteza związków kompleksowych

**Synteza kompleksów 2,6-diacetylopirydyno-(2-aminobenzoilohydrazonu) (ligand L<sup>4</sup>) z azotanami(V) (XLII-XLVIIa) i chlorkami (XLVIII-LI) lantanowców(III)**

Do kolby zawierającej gorący roztwór ligandu L<sup>4</sup> (0,2 mmol) w chloroformie (10 ml) wkroplono roztwór chlorkowej lub azotanowej(V) soli lantanowca(III) (0,2 mmol) w etanolu (10 ml). Po wkropleniu całej ilości soli lantanowca(III) wypadły żółte lub pomarańczowe osady. Reakcję prowadzono 4-5 godzin w temperaturze wrzenia chloroformu pod chłodnicą zwrotną, na mieszadle magnetycznym. Mieszaniny reakcyjne pozostawiono do powolnego ochłodzenia przez noc. Następnego dnia osady odwirowano, przemyto 5 ml metanolu i 5 ml eteru dietylowego i wysuszono w suszarce w temperaturze 60°C. Osady zbadano metodami analitycznymi (analiza elementarna) i spektralnymi (spektrometria mas ESI, spektroskopia w podczerwieni). Wydajność: 24,5% (XLII); 24,1% (XLIII); 15,2% (XLIIIa); 32,8% (XLIV); 88,7% (XLV); 37,3% (XLVI); 73,2% (XLVII); 14,8% (XLVIIa); 74,5% (XLVIII); 10,5% (XLIX); 43,7% (L); 46,1% (LI).

## **4. Syntezy związane z syntetycznymi rybonukleazami**

### **4.1 Synteza, odblokowanie i oczyszczanie nukleotydów i oligonukleotydów RNA i 2'OMe RNA**

We wszystkich eksperymentach oraz w oczyszczaniu oligonukleotydów stosowano wodę o czystości MiliQ.

#### **4.1.1 Synteza RNA i 2'OMe RNA**

Wszystkie nukleotydy i oligonukleotydy RNA i 2'OMe RNA zsyntezowano metodą amidofosforynową na podłożu stałym na syntezaatorze automatycznym typu ABI 392 (Applied Biosystems) lub MerMade 12 (BioAutomatization).

#### **4.1.2 Odblokowanie i odcięcie od podłoża stałego CPG**

##### **4.1.2.1 Odblokowanie i odcięcie od podłoża stałego CPG 2'OMe RNA**

###### **Odcięcie 2'OMe RNA od podłoża CPG**

Do oligonukleotydu na podłożu CPG dodano 2-3 ml 32% wodnego roztworu  $\text{NH}_4\text{OH}$ , reakcje prowadzono przez 18-24 godziny w temperaturze  $55^\circ\text{C}$ , następnie podłoże CPG odsączono i przemyto trzykrotnie 0,5 ml wody. Mieszaninę poreakcyjną odparowano do sucha w wyparce rotacyjnej.

###### **Odblokowanie 2'OMe RNA zawierającego na końcu 5' łącznik 6-aminoheksylowy**

Do oligonukleotydu odciętego od podłoża CPG dodano około 3 ml 80% kwasu octowego, reakcje prowadzono przez 3 godziny w temperaturze pokojowej, następnie mieszaninę reakcyjną odparowano na wyparce rotacyjnej.

### **4.1.2.2 Odblokowanie i odcięcie od podłoża CPG RNA**

#### **Odcięcie RNA od podłoża CPG**

Do oligorybonukleotydu na podłożu CPG dodano 2-3 ml mieszaniny 32% amoniak/etanol w stosunku objętościowym 3:1. Reakcje prowadzono przez 18 godzin w temperaturze 55°C, następnie podłoże CPG odsączono, przemyto trzykrotnie 0,5 ml wody. Mieszaninę poreakcyjną odparowano do sucha w wyparce rotacyjnej.

#### **Odblokowanie grupy tert-butyldimetylosililowej w pozycji 2' RNA**

Oligorybonukleotyd odcięty od podłoża rozpuszczono w 30 µl DMF, do których następnie dodano 270 µl trifluorowodoru trietyloaminy (TEA·3HF), reakcje prowadzono przez 3 godziny w temperaturze 55°C. Następnie do mieszaniny reakcyjnej dodano 5 ml n-butanolu i pozostawiono w -25°C przez 1 godzinę (w celu wytrącenia RNA). Po upływie godziny mieszaninę reakcyjną odwirowywano przez 10 minut w temperaturze +4°C, z prędkością 5000 obrotów na minutę. Roztwór nad osadu zdekantowano, a osad wysuszono w wirówce rotacyjnej.

### **4.1.3 Oczyszczanie oligonukleotydów RNA i 2'OMe RNA**

#### **Elektroforeza**

Na każde 100 ml roztworu żelu poliakrylamidowego (PAA) o żądanym stężeniu dodano 600 µl 10% APS i 40 µl TEMED.

#### **Rozdział na płytkach TLC**

Wodny roztwór oligonukleotydu RNA lub 2'OMe RNA zawierający na końcu 5' łącznik 6-aminoheksylowy naniesiono na płytkę TLC, stosowanym eluentem była mieszanina n-propanol:amoniak:woda 55:35:10 v/v/v.

## Chromatografia HPLC

Stosowane metody w oczyszczaniu oligonukleotydów 2'OMe RNA zawierających na końcu 5' łącznik 6-aminoheksylowy w chromatografii HPLC.

L.p.	Czas [min.]	Stężenie fazy A[%]	Stężenie fazy B[%]	Przepływ [ml/min.]
1	0	100	0	1
2	5	100	0	1
3	38	90	10	1
4	43	50	50	1
5	45	100	0	1

### Skład fazy A

10 mM roztwór  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$

### Skład fazy B

A/ $\text{CH}_3\text{CN}$  1:4 (v/v)

Zebrane frakcje odparowano do sucha na wyparce rotacyjnej. Wykonano widma spektrometrii masowej MALDI

## Kolumnienki z odwróconą fazą C-18 „Sep-Pak”

Kolumnienki z odwróconą fazą C-18 „Sep-Pak” służą do oczyszczania oligonukleotydów RNA i 2'OMe RNA z małocząsteczkowych zanieczyszczeń.

Przygotowanie kolumnienek: kolumnienki przemyto kolejno 10 ml metanolu, 10 ml acetonitrylu i 10 ml 10 mM roztworem octanu amonu. Na tak przygotowaną kolumnienkę naniesiono oligonukleotyd RNA lub 2'OMe RNA rozpuszczony w 10 ml 10 mM octanu amonu. Następnie małocząsteczkowe zanieczyszczenia wymywano z kolumnienki, przemywając ją 10 ml 10 mM octanu amonu. Wymywanie oligonukleotydów prowadzono za pomocą 5 ml roztworu acetonitryl:woda 3:7 v/v. Zebraną frakcję odparowano do sucha na wyparce rotacyjnej.

## Kolumna SEPHADEX G50

Przygotowanie kolumny SEPHADEX G50 do użycia prowadzono przez przemycie jej 15 ml wody. Na przygotowaną kolumnę naniesiono substancję rozpuszczoną w 200  $\mu\text{l}$

wody. Następnie kolumnkę przemywano wodą zbierając jednocześnie 10 frakcji po 1 ml. Wykonano płytkę TLC w celu sprawdzenia, w której frakcji znajduje się oligonukleotyd. Odpowiednie frakcje odparowano na wirówce rotacyjnej i wykonano widma spektrometrii masowej MALDI.

## 4.2 Znakowanie RNA w pozycji 5' fosforem $^{32}\text{P}$

Do środowiska reakcji wprowadzono RNA (100 pmol), 1  $\mu\text{l}$  buforu A PNK, 1  $\mu\text{l}$  kinazy polinukleotydowej faga  $T_4$  i 1  $\mu\text{l}$   $\gamma$ -ATP i uzupełniono wodą do 10  $\mu\text{l}$ . Reakcje prowadzono przez 30 minut w temperaturze 37°C, następnie mieszaninę reakcyjną rozdzielono elektroforetycznie na żelu 12% PAA zawierającym 7 M mocznik (warunki denaturujące).

## 4.3 Reakcje prowadzone na podłożu CPG

### 4.3.1 Reakcje prowadzone z 2'-deoksyadenozyną zawierającą łącznik 6-aminoheksylowy na końcu 5'

#### RI

Do probówki Eppendorfa zawierającej 2'-deoksyadenozynę zawierającą łącznik 6-aminoheksylowy na końcu 5' (około 4  $\mu$ mol) na podłożu CPG, dodano 30-krotny nadmiar bezwodnika kwasu ftalowego (0,12 mmol, 17,8 mg), reakcje prowadzono w pirydynie, przez 24 godziny w temperaturze pokojowej.

#### RI'

Do probówki Eppendorfa zawierającej 2'-deoksyadenozynę zawierającą łącznik 6-aminoheksylowy na końcu 5' (około 4  $\mu$ mol) na podłożu CPG, dodano 30-krotny nadmiar chlorku O-acetylosalicylowego (0,12 mmol, 23,8 mg), reakcje prowadzono w pirydynie, przez 24 godziny w temperaturze pokojowej.

#### RII

Do probówki Eppendorfa zawierającej 2'-deoksyadenozynę zawierającą łącznik 6-aminoheksylowy na końcu 5' (około 4  $\mu$ mol) na podłożu CPG, dodano 90-krotny nadmiarem bezwodnika kwasu ftalowego (0,36 mmol, 53,3 mg), reakcje prowadzono w pirydynie, przez 24 godziny w temperaturze 37°C.

#### RII'

Do probówki Eppendorfa zawierającej 2'-deoksyadenozynę zawierającą łącznik 6-aminoheksylowy na końcu 5' (około 4  $\mu$ mol) na podłożu CPG, dodano 90-krotny nadmiar chlorku O-acetylosalicylowego (0,36 mmol, 71,5 mg), reakcje prowadzono w pirydynie, przez 24 godziny w temperaturze 37°C.

#### RIII

Do probówki Eppendorfa zawierającej 2'-deoksyadenozynę zawierającą łącznik 6-aminoheksylowy na końcu 5' (około 4  $\mu$ mol) na podłożu CPG, dodano 30-krotny nadmiar bezwodnika kwasu ftalowego (0,12 mmol, 17,8 mg), reakcje prowadzono w pirydynie w obecności Et<sub>3</sub>N i DMAP, przez 24 godziny w temperaturze pokojowej.



**RIII'**

Do probówki Eppendorfa zawierającej 2'-deoksyadenozynę zawierającą łącznik 6-aminoheksylowy na końcu 5' (około 4  $\mu\text{mol}$ ) na podłożu CPG, dodano 30-krotny nadmiar chlorku O-acetylosalicylowego (0,12 mmol, 23,8 mg), reakcje prowadzono w pirydynie w obecności  $\text{Et}_3\text{N}$ , przez 24 godziny w temperaturze pokojowej.

**RIV**

Do probówki Eppendorfa zawierającej 2'-deoksyadenozynę zawierającą łącznik 6-aminoheksylowy na końcu 5' (około 4  $\mu\text{mol}$ ) na podłożu CPG, dodano 30-krotny nadmiar bezwodnika kwasu ftalowego (0,12 mmol, 17,8 mg), reakcje prowadzono w chlorku metylenu w obecności  $\text{Et}_3\text{N}$  i DMAP, przez 24 godziny w temperaturze pokojowej.

**RIV'**

Do probówki Eppendorfa zawierającej 2'-deoksyadenozynę zawierającą łącznik 6-aminoheksylowy na końcu 5' (około 4  $\mu\text{mol}$ ) na podłożu CPG, dodano 30-krotny nadmiar chlorku O-acetylosalicylowego (0,12 mmol, 23,8 mg), reakcje prowadzono w chlorku metylenu w obecności  $\text{Et}_3\text{N}$ , przez 24 godziny w temperaturze pokojowej.

**RV**

Do probówki Eppendorfa zawierającej 2'-deoksyadenozynę zawierającą łącznik 6-aminoheksylowy na końcu 5' (około 4  $\mu\text{mol}$ ) na podłożu CPG, dodano 30-krotny nadmiar bezwodnika kwasu ftalowego (0,12 mmol, 17,8 mg), reakcje prowadzono w pirydynie w obecności DIPETA i DMAP, przez 24 godziny w temperaturze pokojowej.

**RV'**

Do probówki Eppendorfa zawierającej 2'-deoksyadenozynę zawierającą łącznik 6-aminoheksylowy na końcu 5' (około 4  $\mu\text{mol}$ ) na podłożu CPG, dodano 30-krotny nadmiar chlorku O-acetylosalicylowego (0,12 mmol, 23,82 mg), reakcje prowadzono w pirydynie w obecności DIPETA, przez 24h w temperaturze pokojowej.

**RVI**

Do probówki Eppendorfa zawierającej 2'-deoksyadenozynę zawierającą łącznik 6-aminoheksylowy na końcu 5' (około 4  $\mu\text{mol}$ ) na podłożu CPG, dodano 30-krotny nadmiar bezwodnika kwasu ftalowego (0,12 mmol, 17,8 mg), reakcje prowadzono w chlorku metylenu w obecności DIPETA i DMAP, przez 24 godziny w temperaturze pokojowej.

**RVI'**

Do probówki Eppendorfa zawierającej 2'-deoksyadenozynę zawierającą łącznik 6-aminoheksylowy na końcu 5' (około 4  $\mu\text{mol}$ ) na podłożu CPG, dodano 30-krotny nadmiar chlorku O-acetylosalicylowego (0,12 mmol, 23,8 mg), reakcje prowadzono w chlorku metylenu w obecności DIPETA, przez 24 godziny w temperaturze pokojowej.

### **4.3.2 Reakcje prowadzone z pentamerem-2'-deoksyadenozyny zawierającym łącznik 6-aminoheksylowy na końcu 5'**

**RVII**

Do probówki Eppendorfa zawierającej pentamer-2'-deoksyadenozyny zawierający łącznik 6-aminoheksylowy na końcu 5' (około 4  $\mu\text{mol}$ ) na podłożu CPG, dodano 30-krotny nadmiar bezwodnika kwasu ftalowego (0,12 mmol, 17,8 mg). Reakcje prowadzono w chlorku metylenu w obecności DMAP, przez 24 godziny w temperaturze pokojowej.

**RVIII**

Do probówki Eppendorfa zawierającej pentamer-2'-deoksyadenozyny zawierający łącznik 6-aminoheksylowy na końcu 5' (około 4  $\mu\text{mol}$ ) na podłożu CPG, dodano 30-krotny nadmiar kwasu O-acetylosalicylowego (aspiryna) (0,12 mmol, 21,6 mg). Reakcje prowadzono w chlorku metylenu w obecności DMAP, przez 24 godziny w temperaturze pokojowej.

**RIX**

Do probówki Eppendorfa zawierającej pentamer-2'-deoksyadenozyny zawierający łącznik 6-aminoheksylowy na końcu 5' (około 4  $\mu\text{mol}$ ) na podłożu CPG, dodano 30-krotny nadmiar chlorku O-acetylosalicylowego (0,12 mmol, 23,8 mg). Reakcje prowadzono w DMF w obecności DCC, przez 24 godziny w temperaturze pokojowej.

### 4.3.3 Reakcje prowadzone z oligonukleotydem **pPSR VI**

#### **RX**

Do probówki Eppendorfa zawierającej oligonukleotyd **pPSR VI** (około 4  $\mu\text{mol}$ ) na podłożu CPG, dodano 30-krotny nadmiar bezwodnika kwasu ftalowego (0,12 mmol, 17,8 mg), reakcje prowadzono w pirydynie, przez 24 godziny w temperaturze pokojowej.

#### **RXI**

Do probówki Eppendorfa zawierającej oligonukleotyd **pPSR VI** (około 4  $\mu\text{mol}$ ) na podłożu CPG, dodano 30-krotny nadmiar kwasu O-acetylosalicylowego (aspiryna) (0,12 mmol, 21,6 mg). Reakcje prowadzono w pirydynie w obecności DMAP, przez 24 godziny w temperaturze pokojowej.

#### **RXII**

Do probówki Eppendorfa zawierającej oligonukleotyd **pPSR VI** (około 4  $\mu\text{mol}$ ) na podłożu CPG, dodano 30-krotny nadmiar chlorku O-acetylosalicylowego 0,12 mmol, 23,8 mg). Reakcje prowadzono w pirydynie w obecności DCC, przez 24 godziny w temperaturze pokojowej.

## 4.4 Reakcje prowadzone w roztworze

### Synteza 6-(*N,N*-ftalylamino)heksyl-*N,N*-diizopropylamino-2-cyanoetylofosforynu (**1**)

Imid kwasu ftalowego (**3**) 330 mg (1,34 mmol) rozpuszczono w 4 ml suchego acetonitrylu i pozostawiono przez 72 godziny nad sitami molekularnymi 3A. Do kolby zawierającej tetrazol 93,5 mg (1,34 mmol) i 2-cyanoetylo-*N,N,N,N*-tetraizopropylamino-2-fosforyn dodano roztwór imidu kwasu ftalowego (**3**) w suchym acetonitrylu. Reakcję prowadzono 24 godziny w temperaturze pokojowej. Przebieg reakcji kontrolowano chromatografią cienkowarstwową TLC. Mieszaninę reakcyjną dodano do nasyconego roztworu wodorowęglanu sodu i wyekstrahowano 5-krotnie 10 ml chlorkiem metylenu. Połączone warstwy organiczne osuszono bezwodnym siarczanem(VI) sodu. Rozpuszczalnik odparowano, otrzymany produkt oczyszczono na kolumnie chromatograficznej stosując eluent *n*-heksan:octan etylu (ze wzrastającym gradientem octanu etylu, końcowe proporcje rozpuszczalników 4:6) z 3% dodatkiem trietyloaminy. Wykonano widma  $^{31}\text{P}$ - NMR.

$^{31}\text{P}$ -NMR (acetonitryl)  $\delta$  147,50

### Synteza 3-metylo-1-ftalimidobutanu (**3**)

Do kolby zawierającej roztwór ftalimidku potasu 0,89 g (4,80 mmol) w DMF (7 ml) dodano roztwór 1-bromo-3-metylobutanu 0,48 ml (4 mmol) w DMF (7 ml). Reakcję prowadzono 3 godziny w temperaturze 75°C. Następnie do roztworu dodano wodny, nasycony roztwór wodorowęglanu sodu, mieszaninę wyekstrahowano 3-krotnie chlorkiem metylenu. Połączone warstwy organiczne osuszono bezwodnym siarczanem(VI) sodu. Przebieg reakcji kontrolowano chromatografią cienkowarstwową. Produkt oczyszczono na kolumnie chromatograficznej. Stosowany eluent to chlorek metylenu z wzrastającym stężeniem metanolu (maks. 20%). Wykonano widmo  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -NMR, COSY i ESI. Wydajność reakcji: 94,3%.

$^1\text{H-NMR}$ ( $\text{CDCl}_3$ )	$\delta$ 7,82 (2H, d, <b>2</b> ); 7,69 (2H, t, <b>1</b> ); 3,69 (2H, t, <b>3</b> ); 1,56 (2H, m, <b>4</b> ); 1,63 (1H, m, <b>5</b> ); 0,94 (6H, s, <b>6</b> )
$^{13}\text{C-NMR}$ ( $\text{CDCl}_3$ )	$\delta$ 22,43 (C- <b>6</b> ); 25,86 (C- <b>5</b> ); 36,44 (C- <b>4</b> ); 37,28 (C- <b>3</b> ); 123,07 (C- <b>1</b> ); 132,17 (C- <b>2</b> ); 133,77 (C- <b>7</b> ) i 168,38 (C- <b>8</b> , C=O)

### Synteza *N*-(6-hydroksyheksylo)ftalimidu (**6**)

Do kolby zawierającej 6-aminoheksanol 0,965 g (8,25 mmol) dodano bezwodnik kwasu ftalowego 1,11 g (7,5 mmol), reakcje prowadzono w benzenie przez 48 godzin w temperaturze wrzenia rozpuszczalnika z jednoczesnym usuwaniem wydzielającej się wody. Przebieg reakcji kontrolowano chromatografią cienkowarstwową. Następnie do roztworu dodano wodny, nasycony roztwór wodorowęglanu sodu, mieszaninę wyestrahowano 3-krotnie chlorkiem metylenu. Połączone warstwy organiczne osuszono bezwodnym siarczanem(VI) sodu. Produkt oczyszczono na kolumnie chromatograficznej. Stosowany eluent to chlorek metylenu z wzrastającym stężeniem metanolu (maks. 15%). Wykonano widmo  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -NMR i COSY. Wydajność reakcji: 95,7%.

$^1\text{H-NMR}$ ( $\text{CDCl}_3$ )	$\delta$ 7,83 (2H, d, <b>1</b> ); 7,69 (2H, t, <b>2</b> ); 3,68 (2H, t, <b>3</b> ); 3,62 (2H, t, <b>4</b> ); 1,68 (2H, m, <b>5</b> ); 1,56 (2H, m, <b>6</b> ); 1,41 (4H, m, <b>7, 7'</b> )
$^{13}\text{C-NMR}$ ( $\text{CDCl}_3$ )	$\delta$ 25,13 (C- <b>7</b> ); 26,44 (C- <b>7'</b> ); 28,48 (C- <b>6</b> ); 32,48 (C- <b>5</b> ); 37,79 (C- <b>4</b> ); 62,65 (C- <b>3</b> ); 123,15 (C- <b>2</b> ); 132,11 (C- <b>1</b> ); 133,86 (C- <b>8</b> ); 168,5 (C- <b>9</b> , C=O)

### Synteza estru monometylowego kwasu ftalowego (**7**)

Do kolby zawierającej 10 ml metanolu wprowadzono bezwodnik kwasu ftalowego 0,222 g (1,5 mmol). Reakcje prowadzono 24 godziny w temperaturze wrzenia metanolu. Po upływie 48 godzin z roztworu wypadł biały, drobnokrystaliczny osad estru monometyloftalowego. Osad przekrystalizowano dwukrotnie z metanolu. Wydajność reakcji: 98,1%.

**Synteza estru monometylo-monoimidobursztynylowego kwasu fталowego (8)**

Do kolby zawierającej ester monometylowy kwasu fталowego (**7**) 0,18 g (1 mmol), DCC 0,310 g (1,5 mmol) i DMAP 0,030 g (0,2 mmol) w 10 ml chlorku metylenu dodano *N*-hydroksyimid kwasu bursztynowego 0,138 g (1,2 mmol). Reakcje prowadzono 24 godziny w temperaturze pokojowej. Przebieg reakcji kontrolowano chromatografią cienkowarstwową. Następnie do roztworu dodano wodny, nasycony roztwór wodorowęglanu sodu, mieszaninę wyestrahowano 3-krotnie chlorkiem metylenu. Połączone warstwy organiczne osuszono bezwodnym siarczanem(VI) sodu. Otrzymany produkt oczyszczono na kolumnie chromatograficznej. Stosowany eluent to chlorek metylenu z wzrastającym stężeniem metanolu (maks. 18%). Wydajność reakcji: 87,0%. Wykonano widmo  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -NMR i COSY.

$^1\text{H}$ -NMR ( $\text{CDCl}_3$ )	$\delta$ 7,92 (1H, d, <b>2</b> ); 7,87 (1H, d, <b>1</b> ); 7,64 (2H, t, <b>3</b> , <b>3'</b> ); 3,92 (3H, s, <b>4</b> ); 2,88 (4H, s, <b>5</b> )
$^{13}\text{C}$ -NMR ( $\text{CDCl}_3$ )	25,65 (C- <b>4</b> ); 52,96 (C- <b>5</b> ); 127,60 (C- <b>3</b> ); 129,54 (C- <b>3'</b> ); 129,92 (C- <b>1</b> ); 131,71 (C- <b>2</b> ); 132,44 (C- <b>6</b> ); 163,18 (C- <b>7</b> ); 166,38 (C- <b>8</b> ); 168,85 (C- <b>9</b> )

**Łączenie końca 5'-nukleotydu z bezwodnikiem kwasu fталowego**

Oligonukleotyd (około 4  $\mu\text{mol}$ ) rozpuszczono w 200  $\mu\text{l}$  wody i dodano 400  $\mu\text{l}$  1 M bufor węglanowy pH=9, następnie w jednej porcji dodano 200  $\mu\text{l}$  roztworu bezwodnika kwasu fталowego 20 mg (0,12 mmol) w DMF. Reakcje prowadzono 24 godziny w temperaturze 55°C. Po zakończeniu reakcji mieszaninę reakcyjną oczyszczono na kolumnkach „sep-pak”. Oligonukleotyd oczyszczono elektroforetycznie na żelu 12% PAA. Po dokonaniu rozdziału elektroforetycznego oligonukleotyd ponownie oczyszczono na kolumnkach „sep-pak” i wykonano widma MALDI. Uzyskano żądany produkt.

**Łączenie końca 5'-nukleotydu z estrem monometylo-monoimidobursztynylowym kwasu ftalowego (8)**

Oligonukleotyd rozpuszczono w 25  $\mu$ l wody i 25  $\mu$ l 0,5 M buforu węglanowego pH=9, następnie dodano 50  $\mu$ l roztworu estru monometylo-monoimidobursztynylowego kwasu ftalowego (20 mg) w DMF. Reakcję prowadzono 18 godzin w temperaturze 37°C. Następnie mieszaninę reakcyjną odparowano do sucha i oczyszczono za pomocą SEPHADEX G50. Wykonano widma MALDI.

## 4.5 Hydroliza RNA – procedury ogólne

### Hydroliza RNA pod wpływem kinazy T<sub>1</sub> (linia 2)

Do probówki Eppendorfa zawierającej 5 µl buforu cytrynowego pH=5,0, dodano 10000 cpm znakowanego γ-RNA i uzupełniono wodą do 7 µl. Mieszaninę reakcyjną inkubowano przez 1,5 minuty w temperaturze 95°C. Następnie dodano 1 µl (0,8 jednostki) kinazy T<sub>1</sub>. Mieszaninę umieszczono w temperaturze 55°C na 10 minut. Tak przygotowaną próbkę naniesiono na żel 12% PAA zawierający 7 M mocznik (warunki denaturujące).

### Hydroliza w środowisku alkalicznym (linia 3)

Do probówki Eppendorfa dodano 3,2 µl formamidu, 3,8 µl 20 mM roztworu chlorku magnezu i 10000 cpm znakowanego γ-RNA. Mieszaninę reakcyjną uzupełniono wodą do 8 µl i inkubowano w temperaturze 95°C przez 20 minut. Po ochłodzeniu mieszaninę naniesiono na żel 12% PAA zawierający 7 M mocznik (warunki denaturujące).

### Tworzenie hybrydy RNA/2'OMe RNA (linia 4)

Do probówki Eppendorfa wprowadzono 1 µl 10 mM buforu Tris-HCl zawierającego 50 mM roztwór chlorku sodu, dodano taką ilość znakowanego γ-RNA by zawierała 10000 cpm oraz syntetyczną rybonukleazę PSR XVII lub PSRXIV. Mieszaninę reakcyjną uzupełniono wodą do 10 µl i inkubowano w temperaturze 90°C przez jedną minutę. Po ochłodzeniu próbkę umieszczono w temperaturze 37°C na 24 godziny. Tak przygotowaną próbkę naniesiono na żel 12% PAA zawierający 7 M mocznik (warunki denaturujące).

### Hydroliza RNA pod wpływem jonu lantanowca(III) (linia 5)

Do probówki Eppendorfa dodano taką ilość znakowanego γ-RNA by zawierała 10000 cpm. Następnie dodano 1 µl 10 mM buforu Tris-HCl zawierającego 50 mM roztwór chlorku sodu, 1 µl 600 µM roztworu chlorku iterbu(III) i uzupełniono wodą do 10



μl. Mieszaninę reakcyjną inkubowano w temperaturze 37°C przez 24 godziny. Następnie mieszaninę reakcyjną naniesiono na żel 12% PAA zawierający 7 M mocznik (warunki denaturujące).

#### **Hydroliza RNA zachodząca pod wpływem syntetycznej rybonukleazy PSR XIV i PSRXVII**

Do probówki Eppendorfa zawierającej RNA z taką ilość znakowanego γ-RNA by zawierała 10000 cpm (końcowe stężenie RNA wynosiło 50 nM) dodano 1 μl 10 mM buforu Tris-HCl zawierającego 50 mM roztwór chlorku sodu i PSRXIV lub PSRXVII w odpowiedniej ilości. Mieszaninę reakcyjną inkubowano w temperaturze 90°C przez jedną minutę i powoli schłodzono. Następnie dodano chlorek iterbu(III) o odpowiednim stężeniu, całość uzupełniono wodą do 10 μl. Reakcję prowadzono w odpowiednich czasach zatrzymując ją poprzez dodanie do mieszaniny reakcyjnej 10 μl roztworu 9 M mocznika zawierającego 25 mM EDTA i 8 M barwnik bromofenyłowy (BB). Tak przygotowaną próbkę nanoszono na żel 12% PAA zawierający 7 M mocznik (warunki denaturujące).

#### **Hydroliza RNA zachodząca pod wpływem związku kompleksowego**

Do probówki Eppendorfa zawierającej RNA z taką ilość znakowanego γ-RNA by zawierała 10000 cpm (końcowe stężenie RNA wynosiło 50 nM) dodano 1 μl 10 mM buforu Tris-HCl zawierającego 50 mM roztwór chlorku sodu i związek kompleksowy o odpowiedniej stężeniu. Reakcję prowadzono w odpowiednich czasach zatrzymując ją poprzez dodanie do mieszaniny reakcyjnej 10 μl roztworu 9 M mocznika zawierającego 25 mM EDTA i 8 M barwnik bromofenyłowy (BB). Tak przygotowaną próbkę nanoszono na żel 12% PAA zawierający 7 M mocznik (warunki denaturujące).

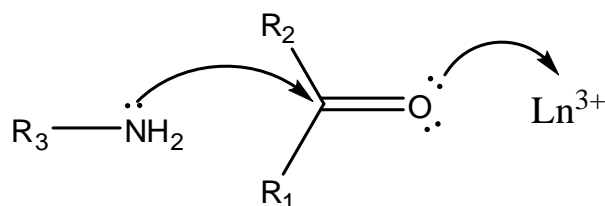
#### **Hydroliza RNA zachodząca pod wpływem związku kompleksowego w obecności 2'OMe RNA I**

Do probówki Eppendorfa zawierającej RNA z taką ilość znakowanego γ-RNA by zawierała 10000 cpm (końcowe stężenie RNA wynosiło 50 nM) dodano 1 μl 10 mM buforu Tris-HCl zawierającego 50 mM roztwór chlorku sodu i 2'OMe RNA I w

odpowiednim stężeniu. Mieszaninę reakcyjną inkubowano w temperaturze 90°C przez jedną minutę i powoli schłodzono. Następnie dodano związek kompleksowy o odpowiednim stężeniu, całość uzupełniono wodą do 10 µl. Reakcję prowadzono w odpowiednich czasach zatrzymując ją poprzez dodanie do mieszaniny reakcyjnej 10 µl roztworu 9 M mocznika zawierającego 25 mM EDTA i 8 M barwnik bromofenyłowy (BB). Tak przygotowaną próbkę nanoszono na żel 12% PAA zawierający 7 M mocznik (warunki denaturujące).

## V. OMÓWIENIE WYNIKÓW

Związki kompleksowe, które przedstawiono w niniejszym rozdziale, otrzymywano głównie metodą templatową. Metoda templatowa (reakcja kondensacji *in situ*) polega na jednoczesnym wprowadzeniu do środowiska reakcji wszystkich reagentów. W tym przypadku są to: związki z grupami karbonyłowymi, grupami aminowymi oraz jon lantanowca. Jon metalu pełni tu rolę templatę (wzorca) (z ang. *template* – wzorec), na którym cząsteczki organiczne układają się w przestrzeni tak, by możliwe było zajście reakcji kondensacji. Dodatkowo jon lantanowca jako twardy kwas chętnie przyjmuje pary elektronowe od twardych zasad, jakimi są atomy tlenu w grupie karbonylowej. Dzięki przeniesieniu części ładunku (pary elektronów) z atomu tlenu grupy karbonylowej na wolne powłoki jonu lantanowca (Rysunek 2), ułatwiony jest atak



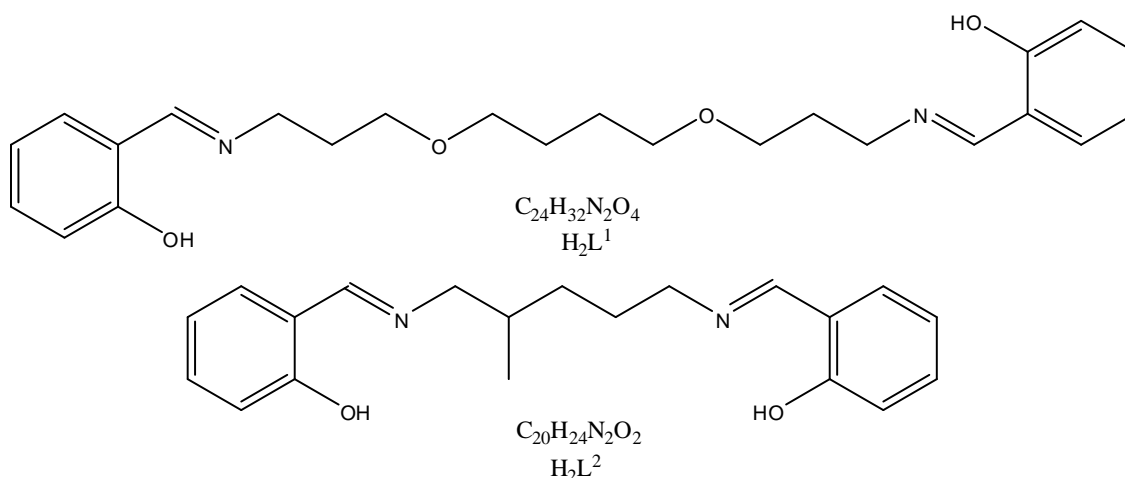
Rysunek 2.

nukleofilowy wolnej pary elektronowej grupy aminowej na karbonyłowy atom węgla, co umożliwia utworzenie wiązania iminowego po wcześniejszej eliminacji cząsteczki wody. Metoda bezpośrednia polega na wcześniejszym zsyntezowaniu, oczyszczeniu i scharakteryzowaniu liganda i następnie skompleksowaniu go z jonem lantanowca(III).

Od wielu lat grupy badawcze zajmują się procesem samoorganizacji cząsteczek w przestrzeni przy zastosowaniu jonów lantanowców(III) jako templatów. W wielu przypadkach wykazano, że metoda templatowa jest jedyną metodą pozwalającą otrzymać wybrane związki kompleksowe i pozwalającą na otrzymanie produktów reakcji w postaci kryształów. W związku z możliwością otrzymania kompleksów typu zasad Schiffa w postaci kryształów i o wiele większej czystości zdecydowano o syntezowaniu ich metodą templatową.[102].

## 1. Związki kompleksowe lantanowców(III) zawierające salenowe zasady Schiffa.

Zastosowanie metody templatowej pozwoliło na otrzymanie nowych związków kompleksowych lantanowców(III) zawierających salenowe zasady Schiffa. Produktami kondensacji dwóch cząsteczek aldehydu salicylowego i jednej cząsteczki 4,9-dioksa-1,12-diaminododekanu ( $H_2L^1$ ) zachodzącej z udziałem azotanów(V) lantanowców(III) są kompleksy zawierające *N,N'*-bis(salicylideno)-1,12-diamino-4,9-dioksadodekan ( $H_2L^1$ ) (I-XIV). Produktami kondensacji dwóch cząsteczek aldehydu salicylowego i jednej cząsteczki 2-metylo-1,5-diaminopentanu zachodzącej w obecności azotanów(V) lantanowców(III) są kompleksy zawierające *N,N'*-bis(salicylideno)-1,5-diamino-2-metylopentan ( $H_2L^2$ ) (XV-XXII) (Rysunek 54). Reakcje prowadzono w różnych warunkach (temperatura, rodzaj rozpuszczalnika, czas prowadzenia reakcji) i w różnym stosunku reagentów aldehyd salicylowy:diamina:jon metalu 2:1:1 i 6:3:2.



Rysunek 54.

Związki kompleksowe scharakteryzowano metodami analitycznymi (analiza elementarna, analiza termogravimetryczna) i spektralnymi (spektroskopia w podczerwieni, spektroskopia masowa ESI).

Na podstawie wyników analizy elementarnej zaproponowano wzory sumaryczne związków kompleksowych oraz stosunek ligandu do metalu (Tabela 1). W przypadku, w którym stosunek reagentów aldehyd salicylowy:diamina:jon metalu wynosił 2:1:1,

otrzymano kompleksy, w których stosunek ligandu do metalu wynosi 1:1 lub 2:2 (Tabela 1) (I-X i XV-XXII). Stosunek ligandu do metalu 2:2 wynika z jednokrotnej deprotonacji jednego z ligandów (VII i IX). W związkach kompleksowych I, IV i VI ligand skoordynowany z jonem centralnym nie jest deprotonowany. W pozostałych przypadkach ligand ulega jednokrotnej deprotonacji. Związek kompleksowy lantanu(III) (XI), w którym stosunek liganda do metalu wyniósł 2:1 (Tabela 1) otrzymano z przesącza, przy zastosowaniu stosunku reagentów aldehyd salicylowy:diamina:jon metalu 2:1:1. Dwa ligandy wchodzące w skład kompleksu nie są deprotonowane.

Tabela 1. Analiza elementarna

	Związek kompleksowy	Analiza elementarna					
		Otrzymano			Obliczono		
		C%	H%	N%	C%	H%	N%
<u>I</u>	$(H_2L^1)La(NO_3)_3(CH_3OH)_2$	40,50	5,27	9,40	38,96	5,03	8,74
<u>II</u>	$(HL^1)Pr(NO_3)_2(H_2O)$	41,04	4,60	8,45	41,51	4,79	8,07
<u>III</u>	$(HL^1)Nd(NO_3)_2(H_2O)$	38,49	5,03	8,20	41,31	4,77	8,03
<u>IV</u>	$(H_2L^1)Sm(NO_3)_3(H_2O)_2$	37,89	4,87	9,33	36,72	4,62	8,92
<u>V</u>	$(HL^1)Eu(NO_3)_2(H_2O)$	38,64	4,94	7,95	40,86	4,71	7,94
<u>VI</u>	$(HL^1)Gd(NO_3)_2(H_2O)$	36,49	4,75	7,87	40,55	4,68	7,88
<u>VII</u>	$(H_2L^1)(HL^1)Dy_2(NO_3)_5(H_2O)_3$	35,86	4,28	7,72	38,10	4,60	8,33
<u>VIII</u>	$(HL^1)Ho(NO_3)_2(H_2O)$	37,76	4,68	7,67	40,12	4,63	7,80
<u>IX</u>	$(HL^1)(H_2L^1)Er_2(NO_3)_5(H_2O)_3$	40,16	4,37	8,31	37,86	4,57	8,28
<u>X</u>	$(HL^1)Tm(NO_3)_2(H_2O)$	44,30	4,45	7,03	39,90	4,60	7,75
<u>XI</u>	$(H_2L^1)_2La(NO_3)_3$	48,91	5,48	8,45	50,13	5,61	8,53
<u>XII</u>	$(L^1)_2Eu_3(NO_3)_5(H_2O)_4$	32,04	4,22	7,18	34,75	4,14	7,60
<u>XIII</u>	$(HL^1)(H_2L^1)_2Dy_2(NO_3)_5(H_2O)_3$	43,50	5,34	7,83	44,91	5,29	8,00
<u>XIV</u>	$(HL^1)(H_2L^1)_2Ho_2(NO_3)_5(H_2O)_2$	43,89	5,35	7,74	45,22	5,22	8,06
<u>XV</u>	$(HL^2)La(NO_3)_2(H_2O)$	37,17	4,51	9,01	39,68	4,33	9,26
<u>XVI</u>	$(HL^2)Pr(NO_3)_2(H_2O)_3$	34,21	4,19	8,82	37,39	4,55	8,72
<u>XVII</u>	$(HL^2)Nd(NO_3)_2(H_2O)$	38,17	4,27	9,10	39,40	4,13	9,19
<u>XVIII</u>	$(HL^2)Sm(NO_3)_2(H_2O)$	40,81	4,41	9,22	39,01	4,09	9,10
<u>XIX</u>	$(HL^2)Dy(NO_3)_2(H_2O)$	39,91	4,35	9,11	38,25	4,01	8,92
<u>XX</u>	$(HL^2)Ho(NO_3)_2(H_2O)$	36,99	4,26	8,47	38,05	4,15	8,87
<u>XXI</u>	$(HL^2)Er(NO_3)_2(H_2O)_2$	34,45	3,97	8,29	36,92	4,18	8,61
<u>XXII</u>	$(HL^2)Yb(NO_3)_2(H_2O)_2$	35,92	4,19	8,16	36,59	4,15	8,53

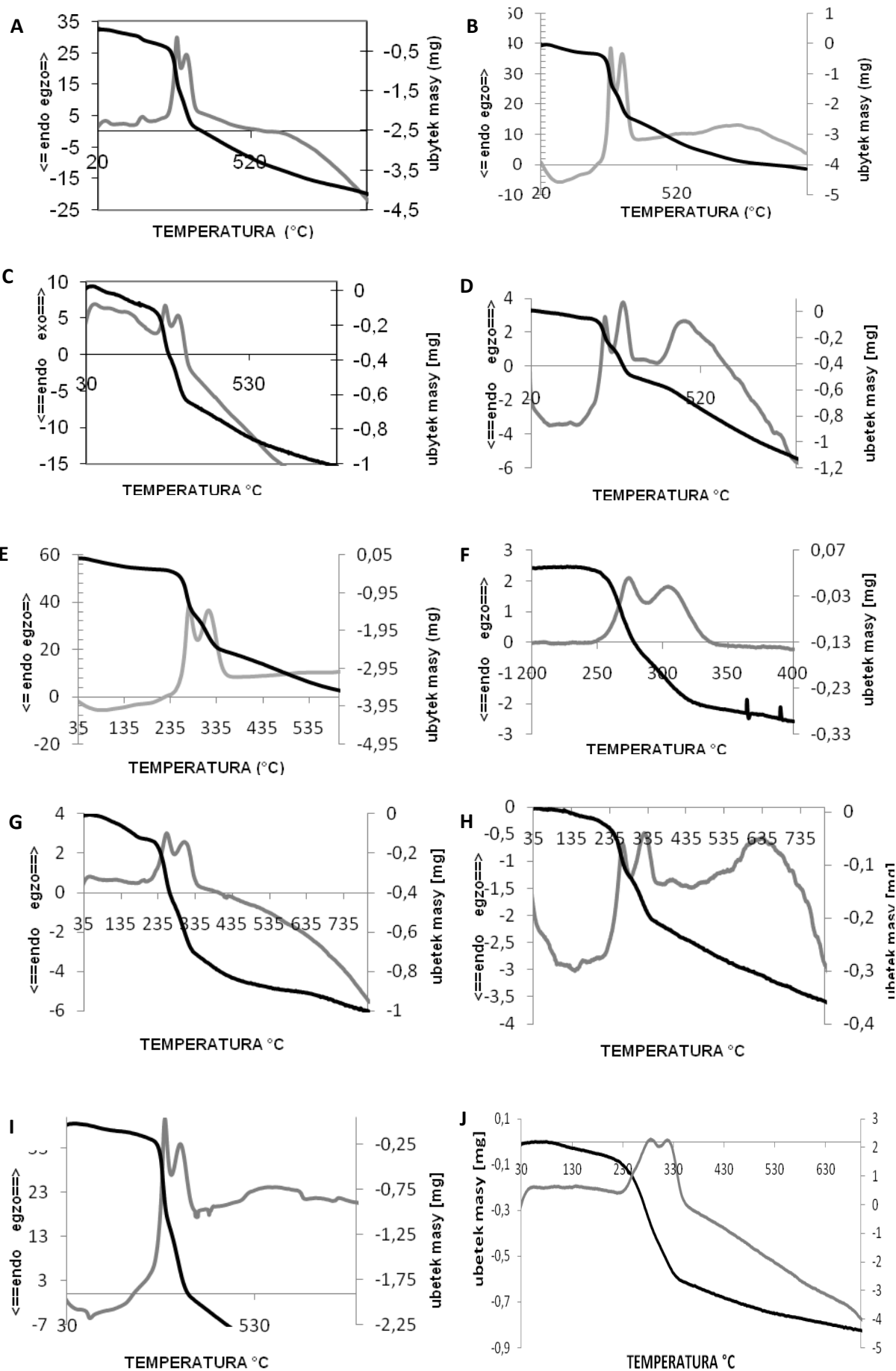
Przeprowadzono szereg reakcji, w których stosunek reagentów aldehyd salicylowy:diamina:jon metalu wynosił 6:3:2, w celu uzyskania kompleksów mogących przyjmować kształt potrójnej helisy dwurdzeniowej (Rysunek 55).

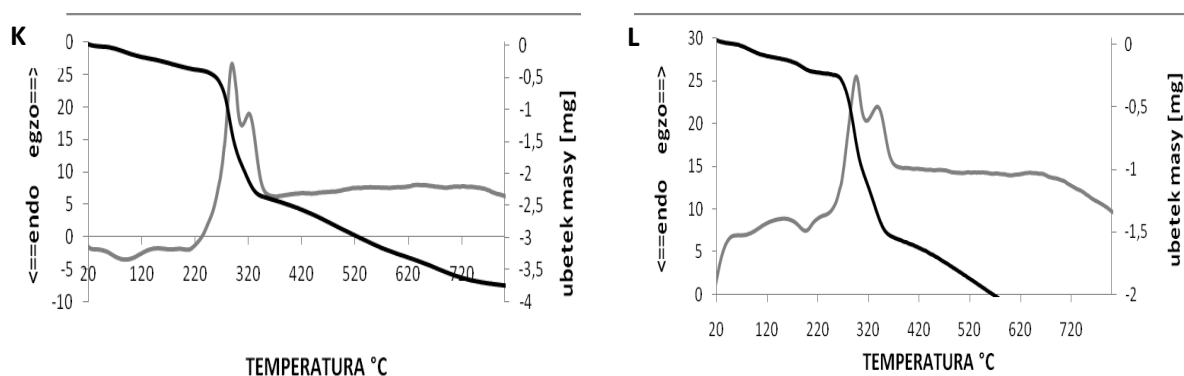


Rysunek 55.

Kompleksy o składzie metal – ligand 2:3 otrzymano tylko w przypadku zastosowania jonów dysprozu(III) (**XIII**) i holmu(III) (**XIV**) (Tabela 1). W pozostałych przypadkach uzyskano mieszaninę produktów i substratów.

Wyniki analizy termograwimetrycznej pozwoliły na określenie wewnętrznej sfery koordynacyjnej otrzymanych kompleksów. Rysunek 56 przedstawia derywatogramy związków kompleksowych zawierających ligand  $H_2L^1$  (A-I) lub  $H_2L^2$  (J-L). We wszystkich kompleksach obserwuje się podobny przebieg rozkładu termicznego (Rysunek 56, Tabela 2). Najpierw następuje odłączenie cząsteczki lub cząsteczek wody (w jednym lub w dwóch etapach), a potem jonów azotanowych(V). Najwyraźniej widać to na derywatogramie kompleksu samaru(III) (**IV**) (Rysunek 56C, Tabela 2). Analiza termograwimetryczna wykazała cztery ubytki masy. Pierwszy przypisano jednej cząsteczce wody znajdującej się w zewnętrznej sferze koordynacyjnej,[103] a drugi ubytek cząsteczce wody znajdującej się w wewnętrznej sferze koordynacyjnej.[104] Trzeci ubytek masy odpowiada dwom jonom azotanowym(V) znajdującym się w zewnętrznej sferze koordynacyjnej, a czwarty jednemu anionowi azotanowemu(V) znajdującemu się w wewnętrznej sferze koordynacyjnej.[105,106]





Derywatogramy związków kompleksowych zawierających ligand  $H_2L^1$  (A-I) lub  $H_2L^2$  (J-L)

A - prazeodymu(III) (II) (podobnie jak gadolinu(III) (VI), holmu(III) (VIII) i tulu(III) (X)), B-neodymu(III) (III) (podobnie jak europu(III) (V)), C - samaru(III) (IV), D - dysprozu(III) (VII), E- erbu(III) (IX), F - lantanu(III) (XI), G - europu(III) (XII), H - dysprozu(III) (XIII), I - holmu(III) (XIV), J - lantanu(III) (XV) (podobnie jak neodymu(III) (XVII), samaru(III) (XVIII), dysprozu(III) (XIX) i holmu(III) (XX)), K - prazeodymu(III) (XVI), L - erbu(III) (XXI) (podobnie jak iterbu(III) (XXII))

Rysunek 56.

Tabela 2. Rozkład termiczny

Wzór związku kompleksowego	Przedział temperatury (TG/°C)		Ubytek masy (%)	
			otrzymany	obliczony
[(HL <sup>1</sup> )Pr(NO <sub>3</sub> )(H <sub>2</sub> O)](NO <sub>3</sub> ) (II)	122-197	1H <sub>2</sub> O	2,576	2,592
	246-281	NO <sub>3</sub>	9,444	8,928
	286-330	NO <sub>3</sub>	9,615	8,928
[(HL <sup>1</sup> )Nd(NO <sub>3</sub> )](NO <sub>3</sub> )(H <sub>2</sub> O) (III)	38-124	1H <sub>2</sub> O	2,512	2,514
	250-278	NO <sub>3</sub>	8,883	9,539
	288-336	NO <sub>3</sub>	8,883	9,289
[(H <sub>2</sub> L <sup>1</sup> )Sm(NO <sub>3</sub> )(H <sub>2</sub> O)](NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O) (IV)	22-124	1H <sub>2</sub> O	2,318	2,293
	124-183	1H <sub>2</sub> O	2,318	2,293
	221-297	2NO <sub>3</sub>	14,230	15,798
	303-332	NO <sub>3</sub>	8,116	7,899
[(HL <sup>1</sup> )Eu(NO <sub>3</sub> )](NO <sub>3</sub> )(H <sub>2</sub> O) (V)	36-141	1H <sub>2</sub> O	2,385	2,553
	242-267	NO <sub>3</sub>	9,239	8,794
	274-319	NO <sub>3</sub>	8,804	8,794
[(HL <sup>1</sup> )Gd(NO <sub>3</sub> )(H <sub>2</sub> O)](NO <sub>3</sub> ) (VI)	78-198	1H <sub>2</sub> O	2,494	2,535
	246-286	NO <sub>3</sub>	9,171	8,720
	301-346	NO <sub>3</sub>	9,031	8,720
[(H <sub>2</sub> L <sup>1</sup> )(HL <sup>1</sup> )Dy <sub>2</sub> (NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>2</sub> ](NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O) (VII)	20-98	1H <sub>2</sub> O	1,163	1,170
	110-207	2H <sub>2</sub> O	2,389	2,340
	233-278	2NO <sub>3</sub>	8,401	8,327
	293-351	3NO <sub>3</sub>	12,423	12,293
[(HL <sup>1</sup> )Ho(NO <sub>3</sub> )(H <sub>2</sub> O)](NO <sub>3</sub> ) (VIII)	83-218	H <sub>2</sub> O	2,543	2,507
	237-283	NO <sub>3</sub>	8,467	8,425
	303-346	NO <sub>3</sub>	8,490	8,425
[(H <sub>2</sub> L <sup>1</sup> )(HL <sup>1</sup> )Er <sub>2</sub> (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>3</sub> ](NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> (IX)	135-173	3H <sub>2</sub> O	3,571	3,546
	214-297	3NO <sub>3</sub>	11,608	12,216



	303-343	2NO <sub>3</sub>	8,482	8,144
[(HL <sup>1</sup> )Tm(NO <sub>3</sub> )(H <sub>2</sub> O)](NO <sub>3</sub> ) (X)	119-192	H <sub>2</sub> O	2,431	2,491
	249-281	NO <sub>3</sub>	9,027	8,582
	292-346	NO <sub>3</sub>	8,680	8,582
[(H <sub>2</sub> L <sup>1</sup> ) <sub>2</sub> La(NO <sub>3</sub> )](NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (XI)	242-283	2NO <sub>3</sub>	11,062	10,966
	289-318	NO <sub>3</sub>	6,385	5,488
[(L <sup>1</sup> ) <sub>2</sub> Eu <sub>3</sub> (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>3</sub> ](NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> (H <sub>2</sub> O) (XII)	51-107	H <sub>2</sub> O	1,032	1,086
	107-214	3H <sub>2</sub> O	3,165	3,256
	217-283	3 NO <sub>3</sub>	11,222	11,211
	283-335	2 NO <sub>3</sub>	7,352	7,474
[(HL <sup>1</sup> )(H <sub>2</sub> L <sup>1</sup> ) <sub>2</sub> Dy <sub>2</sub> (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>3</sub> ](NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> (XIII)	96-210	3 H <sub>2</sub> O	2,800	2,804
	230-275	3 NO <sub>3</sub>	9,975	9,667
	294-328	2 NO <sub>3</sub>	6,713	6,438
[(HL <sup>1</sup> )(H <sub>2</sub> L <sup>1</sup> ) <sub>2</sub> Ho <sub>2</sub> (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O)](NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> (H <sub>2</sub> O) (XIV)	20-121	H <sub>2</sub> O	0,959	0,941
	122-221	H <sub>2</sub> O	0,926	0,941
	271-295	3 NO <sub>3</sub>	9,762	9,728
	307-338	2 NO <sub>3</sub>	6,493	6,485
[(HL <sup>2</sup> )La(NO <sub>3</sub> )(H <sub>2</sub> O)](NO <sub>3</sub> ) (XV)	102-216	H <sub>2</sub> O	2,800	2,980
	233-284	NO <sub>3</sub>	9,952	10,264
	284-347	NO <sub>3</sub>	10,060	10,264
[(HL <sup>2</sup> )Pr(NO <sub>3</sub> )(H <sub>2</sub> O) <sub>2</sub> ](NO <sub>3</sub> )(H <sub>2</sub> O) (XVI)	21-101	H <sub>2</sub> O	2,757	2,804
	102-230	2H <sub>2</sub> O	4,951	5,067
	262-291	NO <sub>3</sub>	9,711	9,657
	292-336	NO <sub>3</sub>	9,749	9,657
[(HL <sup>2</sup> )Nd(NO <sub>3</sub> )(H <sub>2</sub> O)](NO <sub>3</sub> ) (XVII)	69-231	H <sub>2</sub> O	2,886	2,956
	264-292	NO <sub>3</sub>	10,618	10,181
	293-340	NO <sub>3</sub>	9,855	10,181
[(HL <sup>2</sup> )Sm(NO <sub>3</sub> )(H <sub>2</sub> O)](NO <sub>3</sub> ) (XVIII)	98-226	H <sub>2</sub> O	2,890	2,927
	256-294	NO <sub>3</sub>	10,174	10,081
	297-344	NO <sub>3</sub>	10,005	10,081
[(HL <sup>2</sup> )Dy(NO <sub>3</sub> )(H <sub>2</sub> O)](NO <sub>3</sub> ) (XIX)	86-243	H <sub>2</sub> O	2,752	2,871
	261-296	NO <sub>3</sub>	10,402	9,888
	300-349	NO <sub>3</sub>	9,885	9,888
[(HL <sup>2</sup> )Ho(NO <sub>3</sub> )(H <sub>2</sub> O)](NO <sub>3</sub> ) (XX)	89-231	H <sub>2</sub> O	2,770	2,853
	252-297	NO <sub>3</sub>	9,857	9,826
	298-356	NO <sub>3</sub>	9,796	9,826
[(HL <sup>2</sup> )Er(NO <sub>3</sub> )(H <sub>2</sub> O)](NO <sub>3</sub> )(H <sub>2</sub> O) (XXI)	20-107	H <sub>2</sub> O	2,795	2,769
	109-221	H <sub>2</sub> O	2,721	2,769
	264-301	NO <sub>3</sub>	9,558	9,538
	302-361	NO <sub>3</sub>	9,350	9,538
[(HL <sup>2</sup> )Yb(NO <sub>3</sub> )(H <sub>2</sub> O)](NO <sub>3</sub> )(H <sub>2</sub> O) (XXII)	18-129	H <sub>2</sub> O	2,436	2,736
	129-261	H <sub>2</sub> O	2,449	2,736
	261-304	NO <sub>3</sub>	9,622	9,574
	304-364	NO <sub>3</sub>	9,460	9,574

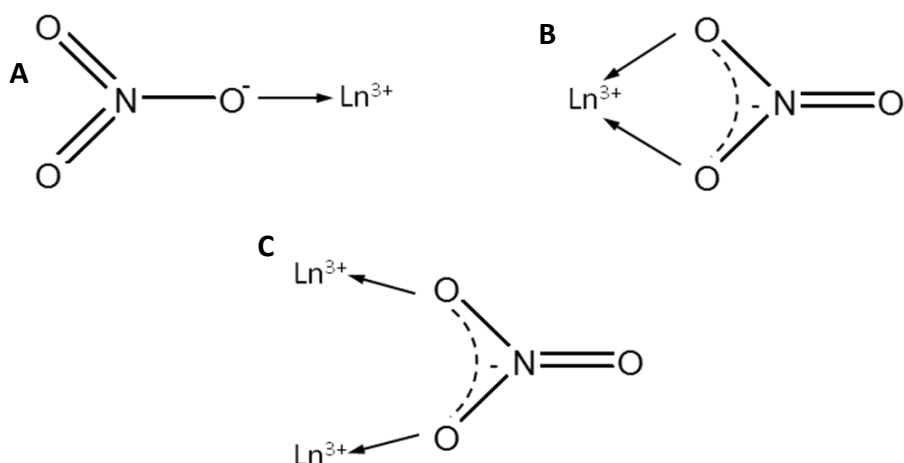
W celu potwierdzenia budowy związków i sposobu koordynacji wykonano badania spektroskopią w podczerwieni (Tabela 3). W widmach w podczerwieni związków kompleksowych lantanowców(III) (I-XXII) znaleziono pasma absorpcji w przedziale 1654-1650  $\text{cm}^{-1}$ , które przypisano drganiom grupy iminowej  $\text{C}=\text{N}$ , powstałej w wyniku kondensacji. Pasma w przedziale 1609-1607  $\text{cm}^{-1}$  odpowiadają drganiom wiązania  $\text{C}=\text{C}$  w pierścieniu aromatycznym. Absorpcja promieniowania przy wartościach liczby falowej 2963-2940  $\text{cm}^{-1}$  i 2877-2859  $\text{cm}^{-1}$  pochodzi od drgań wiązania  $\text{C}-\text{H}$  w części alifatycznej ligandu, a pasma 3461-3297  $\text{cm}^{-1}$  przypisano drganiom wiązania  $\text{O}-\text{H}$ . Związki kompleksowe zawierające w swej strukturze ligand  $\text{H}_2\text{L}^1$  (I-XIV), w widmach w podczerwieni wykazują dodatkowe pasma przy wartościach 1112-1109  $\text{cm}^{-1}$  przypisane drganiom rozciągającym wiązania  $\text{O}-\text{C}-\text{O}$  w części alifatycznej ligandu. Pasma występujące przy 544-539  $\text{cm}^{-1}$  pochodzą od drgań wiązania koordynacyjnego  $\text{M}-\text{O}$  powstającego pomiędzy jonem lantanowca(III) a atomem tlenu z ligandu, natomiast pasma przy długościach fali 491-487  $\text{cm}^{-1}$  przypisano wiązaniu  $\text{M}-\text{N}$  powstającemu pomiędzy atomem azotu a jonem metalu.[107-109]

Tabela 3. Pasma absorpcji w podczerwieni (cm<sup>-1</sup>)

Wzór związku kompleksowego	O-H	C-H	C=N	C=C	C-O-C	M-O	M-N	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>
(H <sub>2</sub> L <sup>1</sup> )La(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> (CH <sub>3</sub> OH) <sub>2</sub> ( <b>I</b> )	3417	2944, 2868	1653	1609	1109	540	488	1760, 1734, 1483, 1385, 1286, 818
(HL <sup>1</sup> )Pr(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O)( <b>II</b> )	3415	2942, 2866	1653	1608	1111	540	489	1767, 1732, 1482, 1384, 1285, 817
(HL <sup>1</sup> )Nd(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O)( <b>III</b> )	3392	2942, 2866	1653	1608	1111	541	490	1767, 1733, 1481, 1384, 1288, 817
(H <sub>2</sub> L <sup>1</sup> )Sm(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>2</sub> ( <b>IV</b> )	3407	2942, 2866	1653	1608	1110	540	489	1767, 1735, 1482, 1384, 1287, 816
(HL <sup>1</sup> )Eu(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O)( <b>V</b> )	3461	2943, 2867	1653	1608	1111	541	488	1767, 1731, 1482, 1384, 1290, 817
(HL <sup>1</sup> )Gd(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O)( <b>VI</b> )	3424	2944, 2867	1654	1609	1112	541	490	1769, 1734, 1486, 1385, 1288, 817
(H <sub>2</sub> L <sup>1</sup> )(HL <sup>1</sup> )Dy <sub>2</sub> (NO <sub>3</sub> ) <sub>5</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>3</sub> ( <b>VII</b> )	3439	2942, 2865	1654	1608	1111	541	491	1771, 1734, 1483, 1384, 1288, 816
(HL <sup>1</sup> )Ho(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O)( <b>VIII</b> )	3440	2942, 2865	1654	1608	1111	540	491	1770, 1734, 1483, 1384, 1288, 816
(HL <sup>1</sup> )(H <sub>2</sub> L <sup>1</sup> )Er <sub>2</sub> (NO <sub>3</sub> ) <sub>5</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>3</sub> ( <b>IX</b> )	3392	2941, 2865	1654	1608	1109	540	490	1768, 1733, 1483, 1384, 1287, 815
(HL <sup>1</sup> )Tm(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O)( <b>X</b> )	3397	2941, 2863	1654	1607	1111	540	491	1768, 1734, 1484, 1384, 1287, 816
(H <sub>2</sub> L <sup>1</sup> ) <sub>2</sub> La(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ( <b>XI</b> )	3433	2940, 2859	1650	1608	1112	539	487	1767, 1741, 1488, 1384, 1286, 819

$(L^1)_2Eu_3(NO_3)_5(H_2O)_4$ ( <b>XII</b> )	3461	2943, 2867	1653	1608	1111	542	488	1767, 1731, 1482, 1384, 1290, 817
$(H_2L^1)(HL^1)_2Dy_2(NO_3)_5(H_2O)_3$ ( <b>XIII</b> )	3355	2941, 2864	1654	1608	1110	540	490	1768, 1734, 1482, 1384, 1288, 816
$(H_2L^1)(HL^1)_2Ho_2(NO_3)_5(H_2O)_2$ ( <b>XIV</b> )	3447	2941, 2863	1653	1608	1111	540	490	1771, 1731, 1483, 1384, 1288, 816
$(HL^2)La(NO_3)_2(H_2O)$ ( <b>XV</b> )	3427	2963, 2877	1651	1608	-	544	490	1767, 1737, 1483, 1384, 1287, 817
$(HL^2)Pr(NO_3)_2(H_2O)_3$ ( <b>XVI</b> )	3421	2962, 2876	1651	1608	-	542	488	1768, 1734, 1480, 1384, 1288, 818
$(HL^2)Nd(NO_3)_2(H_2O)$ ( <b>XVII</b> )	3433	2963, 2877	1652	1608	-	541	487	1768, 1734, 1481, 1384, 1287, 817
$(HL^2)Sm(NO_3)_2(H_2O)$ ( <b>XVIII</b> )	3407	2962, 2877	1653	1608	-	541	489	1769, 1735, 1482, 1385, 1287, 817
$(HL^2)Dy(NO_3)_2(H_2O)$ ( <b>XIX</b> )	3297	2962, 2876	1652	1607	-	541	488	1768, 1734, 1482, 1384, 1288, 816
$(HL^2)Ho(NO_3)_2(H_2O)$ ( <b>XX</b> )	3397	2963, 2876	1652	1607	-	541	488	1768, 1734, 1482, 1384, 1289, 816
$(HL^2)Er(NO_3)_2(H_2O)_2$ ( <b>XXI</b> )	3442	2942, 2876	1652	1608	-	541	490	1772, 1734, 1483, 1384, 1291, 816
$(HL^2)Yb(NO_3)_2(H_2O)_2$ ( <b>XXII</b> )	3438	2961, 2877	1653	1607	-	540	491	1792, 1730, 1483, 1384, 1291, 816

Jon azotanowy(V) może występować w związkach kompleksowych w postaci jonowej lub skoordynowanej. Jon azotanowy(V) może skoordynować z jonem centralnym za pomocą jednego atomu tlenu (jedenokleszczowo, jednofunkcyjnie), dwóch atomów tlenu (dwukleszczowe, dwufunkcyjnie) lub jako mostek (Rysunek 57A-C).[110]

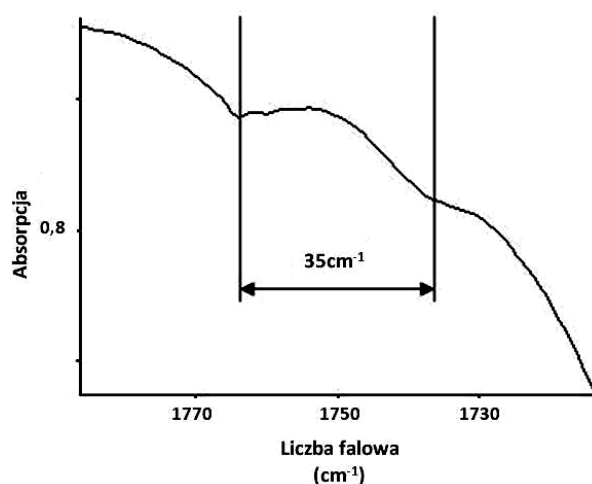


Rysunek 57.

Problem sposobu koordynacji jonów azotanowych(V) z jonem centralnym można rozwiązać na podstawie danych spektroskopowych w podczerwieni. Początkowo twierdzono, że jeżeli w widmie spektroskopii w podczerwieni występuje pasmo pochodzące od  $\text{N}=\text{O}$ , przy wartości liczby falowej około  $1500 - 1600 \text{ cm}^{-1}$ , to występują jony azotanowe(V) dwukleszczowe.[111,112] Wkrótce wykazano jednak, że pasmo absorpcji przy wartości liczby falowej około  $1380 \text{ cm}^{-1}$  pochodzące od wolnego jonu azotanowego(V) (odpowiadające podwójnie zdegenerowanym, asymetrycznym drganiom rozciągającym  $\nu_3$  o symetrii  $D_{3h}$ ) ulega rozszczepieniu podczas koordynacji z jonem centralnym.[113-115] Symetria  $D_{3h}$  ulega redukcji do  $C_{2v}$ . [116] Wówczas pojawiają się dwa nowe pasma absorpcji przy wartościach około  $1600-1420 \text{ cm}^{-1}$  i  $1340-1200 \text{ cm}^{-1}$ . Na podstawie wielkości rozszczepienia tych pasm można określić sposób koordynacji jonu azotanowego(V). Przyjmuje się, że wielkość rozszczepienia większa od  $120 \text{ cm}^{-1}$  jest charakterystyczna dla jonów azotanowych(V) dwukleszczowych, a mniejsza od tej wartości - dla jedenokleszczowych. Pasma absorpcji o małej intensywności w zakresie liczby falowej  $1700-1800 \text{ cm}^{-1}$  także mogą posłużyć do określenia sposobu koordynacji jonów azotanowych(V) z jonem centralnym.[117] Jeżeli wielkość rozszczepienia pasm wynosi  $5-26 \text{ cm}^{-1}$  to przyjmuje się, że jony azotanowe są jedenokleszczowe. W przypadku jonów azotanowych(V) dwukleszczowych wielkość ta

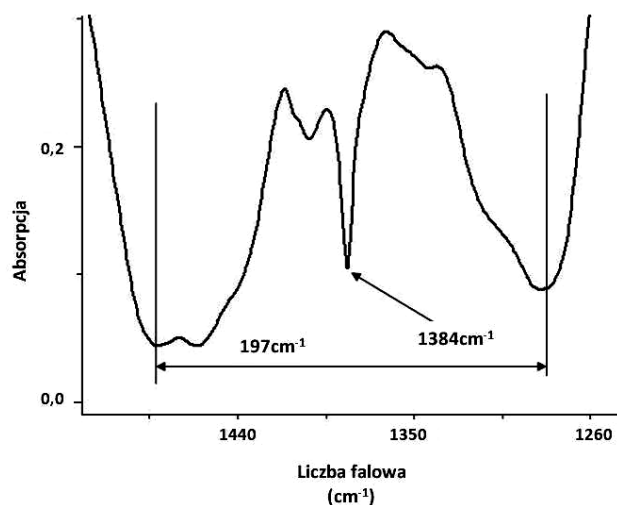
wynosi  $20\text{--}66\text{ cm}^{-1}$ . Wielkość rozszczepienia zależy od rodzaju oddziaływań metal-jon azotanowy(V) i jest ona większa w przypadku występowania jonów azotanowych(V) dwukleszczowych.

W widmach związków kompleksowych zawierających ligand  $\text{H}_2\text{L}^1$  lub  $\text{H}_2\text{L}^2$  pasma przy wartościach  $1792\text{--}1760\text{ cm}^{-1}$  i  $1741\text{--}1730\text{ cm}^{-1}$  przypisano jonom azotanowym(V) skoordynowanym z jonem metalu za pośrednictwem dwóch atomów tlenu. Świadczy o tym wielkość rozszczepienia, która wynosi  $26\text{--}62\text{ cm}^{-1}$  (Rysunek 58).



Widmo w podczerwieni kompleksu prazeodymu(III)(II) z ligandem  $\text{H}_2\text{L}^1$   
Rysunek 58.

W przedziale  $1488\text{--}1285\text{ cm}^{-1}$  zaobserwowano pasma, dla których wielkość rozszczepienia  $\Delta\nu$  wynosi  $192\text{--}202\text{ cm}^{-1}$ , co wskazuje na obecności dwufunkcyjnych jonów azotanowych(V) (Rysunek 59).[118-123]



Widmo w podczerwieni kompleksu prazeodymu(III)(II) z ligandem  $\text{H}_2\text{L}^1$   
Rysunek 59.

Wielkość rozszczepienia dla poszczególnych związków kompleksowych lantanowców(III) przedstawiono w tabeli 4.

Tabela 4.

Związek kompleksowy	Wielkość rozszczepienia w zakresie 1792-1730 cm <sup>-1</sup>	Wielkość rozszczepienia w zakresie 1488-1285 cm <sup>-1</sup>
(H <sub>2</sub> L <sup>1</sup> )La(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> (CH <sub>3</sub> OH) <sub>2</sub> ( <b>I</b> )	26	197
(HL <sup>1</sup> )Pr(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O) ( <b>II</b> )	35	197
(HL <sup>1</sup> )Nd(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O) ( <b>III</b> )	34	193
(H <sub>2</sub> L <sup>1</sup> )Sm(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>2</sub> ( <b>IV</b> )	32	195
(HL <sup>1</sup> )Eu(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O) ( <b>V</b> )	36	192
(HL <sup>1</sup> )Gd(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O) ( <b>VI</b> )	35	198
(H <sub>2</sub> L <sup>1</sup> )(HL <sup>1</sup> )Dy <sub>2</sub> (NO <sub>3</sub> ) <sub>5</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>3</sub> ( <b>VII</b> )	37	195
(HL <sup>1</sup> )Ho(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O) ( <b>VIII</b> )	36	195
(HL <sup>1</sup> )(H <sub>2</sub> L <sup>1</sup> )Er <sub>2</sub> (NO <sub>3</sub> ) <sub>5</sub> (H <sub>2</sub> O) ( <b>IX</b> )	35	196
(HL <sup>1</sup> )Tm(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O) ( <b>X</b> )	34	197
(H <sub>2</sub> L <sup>1</sup> ) <sub>2</sub> La(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ( <b>XI</b> )	26	202
(L <sup>1</sup> ) <sub>2</sub> Eu <sub>3</sub> (NO <sub>3</sub> ) <sub>5</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>4</sub> ( <b>XII</b> )	36	192
(H <sub>2</sub> L <sup>1</sup> )(HL <sup>1</sup> ) <sub>2</sub> Dy <sub>2</sub> (NO <sub>3</sub> ) <sub>5</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>3</sub> ( <b>XIII</b> )	34	194
(H <sub>2</sub> L <sup>1</sup> )(HL <sup>1</sup> ) <sub>2</sub> Ho <sub>2</sub> (NO <sub>3</sub> ) <sub>5</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>2</sub> ( <b>XIV</b> )	40	195
(HL <sup>2</sup> )La(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O) ( <b>XV</b> )	30	196
(HL <sup>2</sup> )Pr(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>3</sub> ( <b>XVI</b> )	34	192
(HL <sup>2</sup> )Nd(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O) ( <b>XVII</b> )	34	194
(HL <sup>2</sup> )Sm(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O) ( <b>XVIII</b> )	34	195
(HL <sup>2</sup> )Dy(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O) ( <b>XIX</b> )	34	194
(HL <sup>2</sup> )Ho(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O) ( <b>XX</b> )	34	193
(HL <sup>2</sup> )Er(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>2</sub> ( <b>XXI</b> )	38	192
(HL <sup>2</sup> )Yb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>2</sub> ( <b>XXII</b> )	62	192

Absorpcja przy wartościach 819-815 i 1385-1384 cm<sup>-1</sup> może świadczyć o obecności w związkach kompleksowych jonu azotanowego(V) nieskoordynowanego z jodem metalu.[124,125]

Badania spektroskopią masową ESI wykonywano w metanolu. Na podstawie wyników spektroskopii masowej ESI ustalono, że wszystkie związki kompleksowe zawierają odpowiednią zasadę Schiffa, to znaczy *N,N'*-bis(salicylideno)-1,12-diamino-4,9-dioksadodekan lub *N,N'*-bis(salicylideno)-1,5-diamino-2-metylopentan i rozpadają się na jony fragmentacyjne. W większości przypadków zaobserwowano jony fragmentacyjne składające się z jonu metalu skoordynowanego z ligandem, a także z przeciwjonami azotanowymi(V). Wyniki zostały przedstawione w tabeli 5.

Tabela 5.

Związek kompleksowy	Kompleks	Pik	Jon fragmentacyjny
$(H_2L^1)La(NO_3)_3(CH_3OH)_2$	<b>I</b>	263	$[La(NO_3)_2]^+$
		387	$[La(NO_3)_4]^-$
		413	$[(C_{24}H_{32}N_2O_4)+H]^+$
		549	$[(C_{24}H_{30}N_2O_4)La]^+$
$(HL^1)Pr(NO_3)_2(H_2O)$	<b>II</b>	389	$[Pr(NO_3)_4]^-$
		413	$[(C_{24}H_{32}N_2O_4)+H]^+$
		675	$[(C_{24}H_{30}N_2O_4)Pr(NO_3)_2]^-$
$(HL^1)Nd(NO_3)_2(H_2O)$	<b>III</b>	392	$[Nd(NO_3)_4]^-$
		413	$[(C_{24}H_{32}N_2O_4)+H]^+$
		678	$[(C_{24}H_{30}N_2O_4)Nd(NO_3)_2]^-$
$(H_2L^1)Sm(NO_3)_3(H_2O)_2$	<b>IV</b>	391	$[Sm(NO_3)_4]^-$
		411	$[(C_{24}H_{31}N_2O_4)]^-$
		413	$[(C_{24}H_{32}N_2O_4)+H]^+$
		562	$[(C_{24}H_{30}N_2O_4)Sm]^+$
$(HL^1)Eu(NO_3)_2(H_2O)$	<b>V</b>	400	$[Eu(NO_3)_4]^-$
		413	$[(C_{24}H_{32}N_2O_4)+H]^+$
		562	$[(C_{24}H_{30}N_2O_4)Eu]^+$
$(HL^1)Gd(NO_3)_2(H_2O)$	<b>VI</b>	375	$[(C_{24}H_{30}N_2O_4)Gd(NO_3)_3]^{2-}$ (377)
		406	$[Gd(NO_3)_4]^-$
$(H_2L^1)(HL^1)Dy_2(NO_3)_5(H_2O)_3$	<b>VII</b>	376	$[(C_{24}H_{30}N_2O_4)Dy(NO_3)_3]^{2-}$ (379)
		409	$[Dy(NO_3)_4]^-$
		413	$[(C_{24}H_{32}N_2O_4)+H]^+$
$(HL^1)Ho(NO_3)_2(H_2O)$	<b>VIII</b>	377	$[(C_{24}H_{30}N_2O_4)Ho(NO_3)_3]^{2-}$ (380)
		413	$[(C_{24}H_{32}N_2O_4)+H]^+$
		466	$[Ho(H_2O)_3(NO_3)_4]^-$
$(HL^1)(H_2L^1)Er_2(NO_3)_5(H_2O)_3$	<b>IX</b>	412	$[(C_{24}H_{31}N_2O_4)]^-$ / $[Er(NO_3)_4]^-$
		413	$[(C_{24}H_{32}N_2O_4)+H]^+$
		578	$[(C_{24}H_{30}N_2O_4)Er]^+$
		702	$[(C_{24}H_{30}N_2O_4)Er(NO_3)_2]^-$
$(HL^1)Tm(NO_3)_2(H_2O)$	<b>X</b>	413	$[(C_{24}H_{32}N_2O_4)+H]^+$
		416	$[Tm(NO_3)_4]^-$
		579	$[(C_{24}H_{30}N_2O_4)Tm]^+$
		703	$[(C_{24}H_{30}N_2O_4)Tm(NO_3)_2]^-$

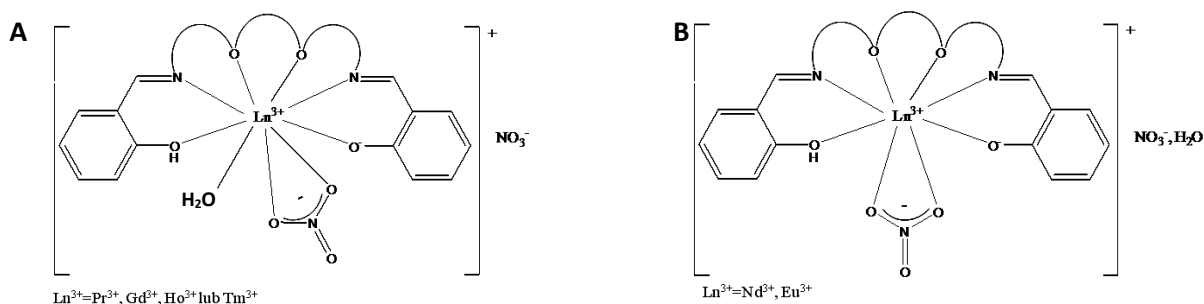


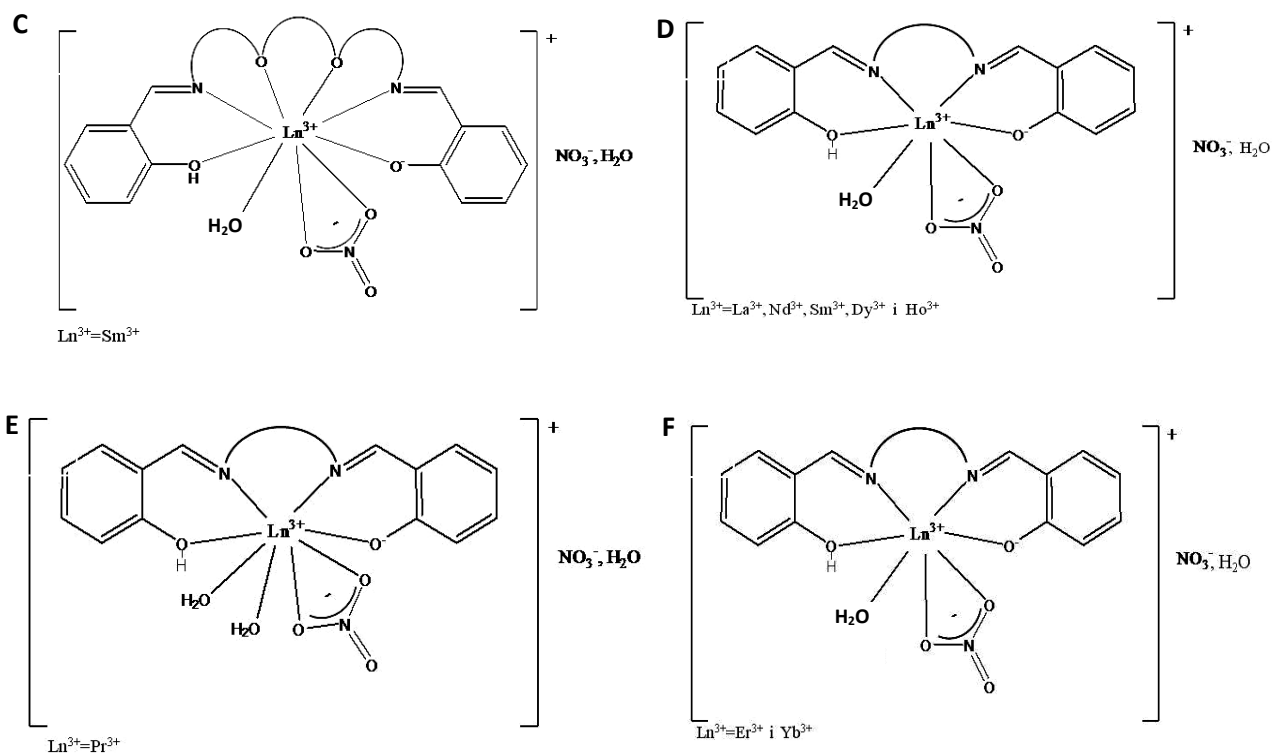
$(H_2L^1)_2La(NO_3)_3$	<b>XI</b>	263	$[La(NO_3)_2]^+$
		413	$[(C_{24}H_{32}N_2O_4)+H^+]^+$
		387	$[La(NO_3)_4]^-$
		549	$[(C_{24}H_{30}N_2O_4)La]^+$
$(L^1)_2Eu_3(NO_3)_5(H_2O)_4$	<b>XII</b>	274	$[Eu(NO_3)_2]^+$
		398	$[Eu(NO_3)_4]^-$
		563	$[(C_{24}H_{30}N_2O_4)Eu]^+$
		687	$[(C_{24}H_{30}N_2O_4)Eu(NO_3)_2]$
$(HL^1)_2(H_2L^1)Dy_2(NO_3)_5(H_2O)_3$	<b>XIII</b>	383	$[(C_{24}H_{30}N_2O_4)Dy(NO_3)_3]^{2-}$ (380)
		412	$[(C_{24}H_{32}N_2O_4)+H^+]^+$
		469	$[Dy(H_2O)_3(NO_3)_4]^-$ (465)
$(HL^1)_2(H_2L^1)Ho_2(NO_3)_5(H_2O)_2$	<b>XIV</b>	413	$[(C_{24}H_{32}N_2O_4)+H^+]^+$
		466	$[Ho(H_2O)_3(NO_3)_4]^-$
$(HL^2)La(NO_3)_2(H_2O)$	<b>XV</b>	325	$[C_{20}H_{24}N_2O_2+H^+]^+$
		387	$[La(NO_3)_4]^-$
		524	$[(C_{20}H_{23}N_2O_2)La(NO_3)]^+$
$(HL^2)Pr(NO_3)_2(H_2O)_3$ (XVI)	<b>XVI</b>	325	$[C_{20}H_{24}N_2O_2+H^+]^+$
		389	$[Pr(NO_3)_4]^-$
		448	$[(C_{20}H_{22}N_2O_2)Pr(NO_3)_2]^-$
$(HL^2)Nd(NO_3)_2(H_2O)$ (XVII)	<b>XVII</b>	325	$[C_{20}H_{24}N_2O_2+H^+]^+$
		390	$[Nd(NO_3)_4]^-$
		466	$[(C_{20}H_{22}N_2O_2)Nd]^+$
$(HL^2)Sm(NO_3)_2(H_2O)$ (XVIII)	<b>XVIII</b>	325	$[C_{20}H_{24}N_2O_2+H^+]^+$
		347	$[C_{20}H_{24}N_2O_2+Na^+]^+$
		400	$[Sm(NO_3)_4]^-$
		461	$[Sm(NO_3)_5+H^+]^-$
		601	$[(C_{20}H_{22}N_2O_2)Sm(NO_3)_2]^-$
$(HL^2)Dy(NO_3)_2(H_2O)$ (XIX)	<b>XIX</b>	323	$[C_{20}H_{23}N_2O_2]^-$
		325	$[C_{20}H_{24}N_2O_2+H^+]^+$
		347	$[C_{20}H_{24}N_2O_2+Na^+]^+$
		411	$[Dy(NO_3)_4]^-$
		471	$[Dy(NO_3)_5+H^+]^-$
		608	$[(C_{20}H_{22}N_2O_2)Dy(NO_3)_2]^-$
$(HL^2)Ho(NO_3)_2(H_2O)$ (XX)	<b>XX</b>	325	$[C_{20}H_{24}N_2O_2+H^+]^+$
		347	$[C_{20}H_{24}N_2O_2+Na^+]^+$
		413	$[Ho(NO_3)_4]^-$
		472	$[Ho(NO_3)_5+H^+]^-$
$(HL^2)Er(NO_3)_2(H_2O)_2$ (XXI)	<b>XXI</b>	325	$[C_{20}H_{24}N_2O_2+H^+]^+$
		612	$[(C_{20}H_{22}N_2O_2)Er(NO_3)_2]^-$
$(HL^2)Yb(NO_3)_2(H_2O)_2$ (XXII)	<b>XXII</b>	347	$[C_{20}H_{24}N_2O_2+Na^+]^+$
		620	$[(C_{20}H_{22}N_2O_2)Yb(NO_3)_2]^-$

Reakcje prowadzono w acetonitrylu, metanolu, etanolu, metanol:chloroform 9:1 (v:v). Pozytywne rezultaty uzyskano tylko przy zastosowaniu metanolu lub etanolu. W przypadku zastosowania acetonitrylu i mieszaniny rozpuszczalników metanol:chloroform 9:1 (v:v) żółte osady выпадаły po około 3 minutach od momentu dodania wszystkich reagentów. Osady zbadano metodami spektroskopowymi i analitycznymi, ale nie uzyskano pozytywnych rezultatów. Uzyskano mieszaninę produktów kondensacji [2+1], [1+1] i substratów.

W wyniku przeprowadzonych reakcji otrzymano nowe związki kompleksowe lantanowców zawierające w swej strukturze ligand  $H_2L^1$  lub  $H_2L^2$ . Związki kompleksowe **I-XXII** otrzymano metoda templatową. Ustalono wzór sumaryczny, sferę koordynacyjną (wewnętrzną i zewnętrzną) oraz sposób koordynacji jonu centralnego. W związkach kompleksowych o składzie metal – ligand 1:1, w wewnętrznej sferze koordynacyjnej znajduje się jedna cząsteczka ligandu jednokrotnie deprotonowanego (wyjątek stanowi kompleks **IV**), dwukleszczowy jon azotanowy(V) i jedna cząsteczka wody (wyjątek stanowią związki kompleksowe **III** i **V** – cząsteczka wody znajduje się zewnętrznej sferze koordynacyjnej). Jony centralne w kompleksach o składzie metal – ligand 2:3 (kompleks **XIV** i **XV**) koordynują z trzema ligandami, dwoma dwukleszczowymi jonami azotanowymi(V) i trzema cząsteczkami wody.

Na podstawie uzyskanych danych zaproponowano sposób koordynacji dla kompleksów o składzie metal – ligand 1:1 (Rysunek 60 A-F).





Proponowany sposób koordynacji związków kompleksowych: a) prazeodymu(III) (II), gadolinu(III) (VI), holmu(III) (VIII) lub tulu(III) (X); b) neodymu(III) (III), europu(III) (V); c) samaru(III) (IV); d) lantanu(III) (XV), neodymu(III) (XVII), samaru(III) (XVIII), dysprozu(III) (XIX) lub holmu(III) (XX); e) prazeodymu(III) (XVI); f) erbu(III) (XXI) lub iterbu(III) (XXII)

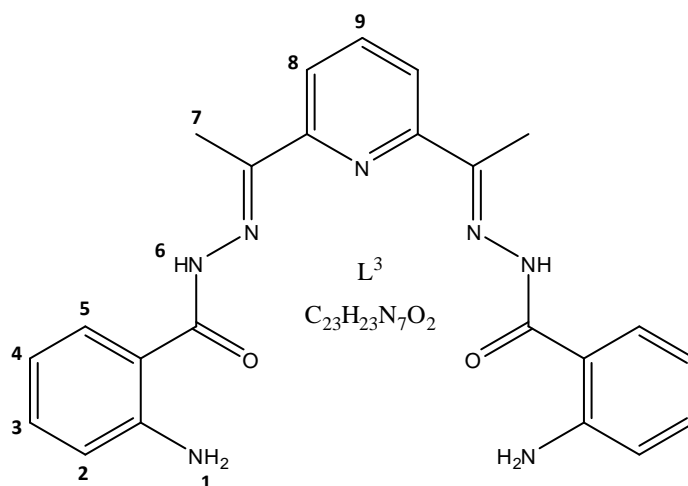
Rysunek 60.

Wyniki dotyczących syntezy i charakterystyki związków kompleksowych prazeodymu(III), neodymu(III) i europu(III) z ligandem  $\text{H}_2\text{L}^1$  zostały opublikowane.[126]

## 2. Związki kompleksowe lantanowców(III) zawierające hydrazonowe zasady Schiffa

### 2.1 Związki kompleksowe lantanowców(III) z 2,6-diacetylopirydyno-bis(2-aminobenzoiłohydrazonem) – ligand $L^3$

Związki kompleksowe lantanowców(III) zawierające 2,6-diacetylopirydyno-bis(2-aminobenzoiłohydrazon) (ligand  $L^3$ , Rysunek 61) otrzymano metodą templatową w reakcji jednej cząsteczki 2,6-diacetylopirydyny i dwóch cząsteczek 2-aminobenzoiłohydrazdu w obecności azotanu(V) lub chlorku odpowiedniego lantanowca(III).



Rysunek 61.

Związki kompleksowe scharakteryzowano metodami analitycznymi (analiza elementarna) i spektralnymi (spektroskopia w podczerwieni, spektrometria masowa ESI). Związki kompleksowe ( $L^3$ )Eu(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>(CH<sub>3</sub>OH) XXVII, ( $L^3$ )Gd(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>(CH<sub>3</sub>OH) XXVIII, ( $L^3$ )Tb(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>(CH<sub>3</sub>OH) XXIX, ( $L^3$ )Dy(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(CH<sub>3</sub>OH) XXX, ( $L^3$ )Er(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(OH)(H<sub>2</sub>O) XXXII i ( $L^3$ )<sub>2</sub>NdCl<sub>3</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>8</sub> XXXVI otrzymano w postaci kryształów i określono strukturę krystaliczną za pomocą dyfrakcji promieni rentgenowskich. Wartości analizy elementarnej kompleksów XXVII-XXX, XXXII i XXXVI obliczono w oparciu o struktury krystaliczne. Wyznaczenie temperatury topnienia i wykonanie analizy

termogravimetrycznej było niemożliwe ze względu na gwałtowny rozpad związków kompleksowych w wyższych temperaturach.

Zsyntezowano także ligand  $L^3$ , którego dane analityczne i spektralne porównano z danymi ligandu  $L^3$  skoordynowanego z jonami lantanowców(III). Porównanie to pozwoliło określić udział atomów donorowych liganda  $L^3$  w tworzących się wiązaniach koordynacyjnych.

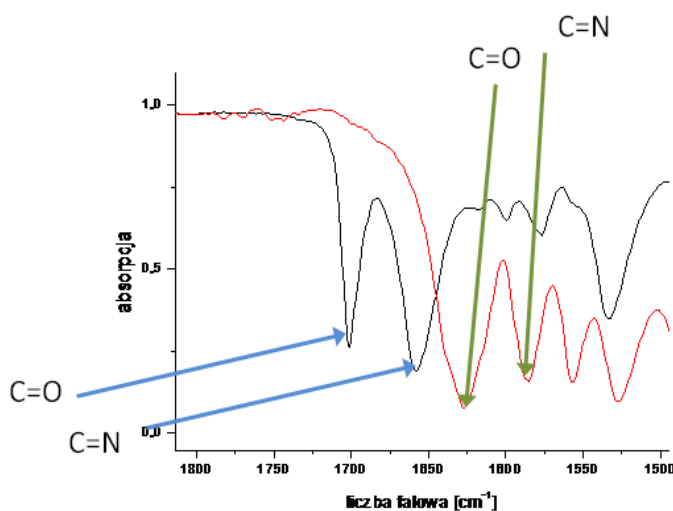
Na podstawie analizy elementarnej ustalono wzory sumaryczne otrzymanych związków kompleksowych (Tabela 6). Zawierają one w swej strukturze trzy jony azotanowe(V) (lub chlorkowe), jedną cząsteczkę ligandu, jon lantanowca(III) oraz cząsteczki wody lub metanolu. Wyjątek stanowi kompleks neodymu(III)  $(L^3)_2NdCl_3(H_2O)_8$  (XXXVI), który zawiera dwie cząsteczki ligandu.[127, 128]

Tabela 6. Analiza elementarna

Związek kompleksowy	Analiza elementarna					
	Otrzymano			Obliczono		
	C%	H%	N%	C%	H%	N%
$L^3$	64,36	5,53	22,94	64,32	5,40	22,83
$(L^3)La(NO_3)_3(H_2O)_2$ (XXIII)	35,32	3,49	17,54	34,95	3,44	17,72
$(L^3)Pr(NO_3)_3(H_2O)_3$ (XXIV)	32,09	3,33	16,03	34,09	3,61	17,28
$(L^3)Nd(NO_3)_3(CH_3OH)_2$ (XXV)	35,41	3,86	17,96	36,45	3,79	17,00
$(L^3)Sm(NO_3)_3(H_2O)$ (XXVI)	35,30	3,27	17,91	35,24	3,21	17,87
$(L^3)Eu(NO_3)_3(CH_3OH)$ (XXVII)	35,71	4,23	17,57	36,05	3,40	17,52
$(L^3)Gd(NO_3)_3(CH_3OH)$ (XXVIII)	35,76	3,71	17,71	35,82	3,38	17,40
$(L^3)Tb(NO_3)_3(CH_3OH)$ (XXIX)	34,04	3,77	17,48	35,74	3,37	17,37
$(L^3)Dy(NO_3)_2(CH_3OH)$ (XXX)	37,29	3,48	17,81	35,59	3,36	17,29
$(L^3)Ho(NO_3)_3(CH_3OH)$ (XXXI)	36,58	3,29	17,45	35,48	3,35	17,24
$(L^3)Er(NO_3)_2(OH)(H_2O)$ (XXXII)	32,60	3,48	16,93	36,55	3,47	16,68
$(L^3)Tm(NO_3)_3(CH_3OH)_3$ (XXXIII)	37,15	4,22	16,83	35,46	4,01	15,91
$(L^3)Yb(NO_3)_3(CH_3OH)$ (XXXIV)	37,22	3,29	17,00	35,13	3,32	17,07

$(L^3)LaCl_3(H_2O)_8$ (XXXV)	32,44	5,50	11,57	33,01	4,94	11,72
$(L^3)_2NdCl_3(H_2O)_8$ (XXXVI)	33,16	4,78	11,91	44,07	4,98	15,64
$(L^3)GdCl_3(H_2O)_7$ (XXXVII)	33,28	4,52	11,76	33,72	4,55	11,97
$(L^3)TbCl_3(H_2O)_7$ (XXXVIII)	32,46	4,64	11,46	33,65	4,54	11,94
$(L^3)DyCl_3(H_2O)_8$ (XXXIX)	31,09	5,07	11,25	32,79	4,67	11,64
$(L^3)HoCl_3(H_2O)_8$ (XL)	31,38	4,94	11,35	32,70	4,65	11,60
$(L^3)ErCl_3(H_2O)_8$ (XLI)	34,36	5,11	10,67	32,61	4,64	11,57

Pasma absorpcji ligandu  $L^3$  nieskoordynowanego i skoordynowanego z jonami lantanowców(III) przedstawiono w tabeli 7. Pasma absorpcji przy wartościach 3460 i 3347  $cm^{-1}$  odpowiadające drganiom grupy  $NH_2$  w wolnym ligandzie nie różnią się znacznie od pasm występujących w związkach kompleksowych, co może sugerować brak koordynacji grupy aminowej z jonem lantanowca(III). [129] Wyjątek stanowią kompleksy prazeodymu(III)  $(L^3)Pr(NO_3)_3(H_2O)_3$  (XXIV) i neodymu(III)  $(L^3)Nd(NO_3)_3(CH_3OH)_2$  (XXV), w widmach których pasma absorpcji występują odpowiednio przy wartościach liczby falowej 3483, 3477  $cm^{-1}$  i 3375, 3371  $cm^{-1}$ , co może świadczyć o pewnym zaangażowaniu grupy  $NH_2$  w koordynacji z jonem centralnym.



Widmo absorpcji ligandu  $L^3$

Widmo absorpcji kompleksu europu(III) (XXVII)

Rysunek 62.

Pasma przy wartości 1701 i 1657  $cm^{-1}$  przypisano odpowiednio wiązaniami C=O (wiązanie amidowe I) i C=N (wiązanie iminowe), które w związkach kompleksowych

ulegają przesunięciu w kierunku liczby falowej o mniejszej wartości (Rysunek 62), co wskazuje na udział powyższych wiązań w koordynacji jonu europu(III). Wielkość przesunięcia wynosi 70-83  $\text{cm}^{-1}$ . [130-133]

# OMÓWIENIE WYNIKÓW

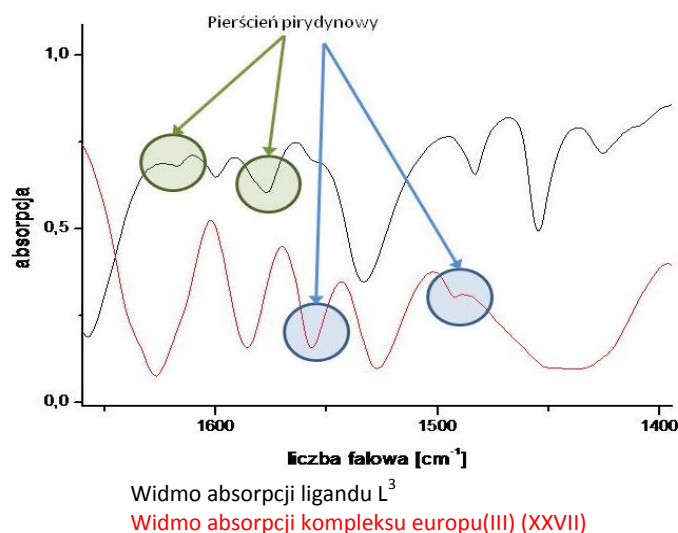
Tabela 7. Pasma absorpcji w podczerwieni (cm<sup>-1</sup>)

Wzór kompleksu	NH <sub>2</sub>		C=O	C=N	II amid	III	C=C	N-N	M-O	M-N	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>
	v <sub>as</sub>	v <sub>s</sub>	amid I			amid					
Ligand L <sup>3</sup>	3460	3347	1701	1657	1533	1245	1617, 1577	1026	-	-	-
(L <sup>3</sup> )La(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>2</sub> (XXIII)	3468	3356	1631	1586	1528	1253	1556, 1492	1033	574	526	1769, 1738, 1444, 1385, 1299, 816
(L <sup>3</sup> )Pr(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>3</sub> (XXIV)	3483	3375	1629	1586	1530	1252	1556, 1487	1034	550	528	1769, 1460, 1384, 1301, 815
(L <sup>3</sup> )Nd(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> (CH <sub>3</sub> OH) <sub>2</sub> (XXV)	3477	3371	1628	1586	1526	1250	1554, 1487	1035	554	528	1778, 1739, 1458, 1384, 1299, 817
(L <sup>3</sup> )Sm(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> (H <sub>2</sub> O) (XXVI)	3464	3352	1627	1585	1528	1252	1556, 1493	1038	550	528	1780, 1742, 1448, 1384, 1301, 816
(L <sup>3</sup> )Eu(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> (CH <sub>3</sub> OH) (XXVII)	3463	3350	1627	1586	1527	1251	1557, 1492	1039	550	530	1781, 1744, 1451, 1384, 1301, 816
(L <sup>3</sup> )Gd(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> (CH <sub>3</sub> OH) (XXVIII)	3464	3350	1628	1585	1527	1251	1557, 1493	1040	551	530	1785, 1744, 1450, 1384, 1301, 816
(L <sup>3</sup> )Tb(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> (CH <sub>3</sub> OH) (XXIX)	3466	3350	1622	1579	1529	1249	1549, 1488	1043	550	534	1786, 1757, 1453, 1384, 1301, 816
(L <sup>3</sup> )Dy(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (CH <sub>3</sub> OH) (XXX)	3456	3343	1620	1580	1525	1257	1553, 1492	1036	551	541	1781, 1739, 1461, 1384, 1305, 807



$(L^3)Ho(NO_3)_3(CH_3OH)$ (XXXI)	3456	3342	1619	1581	1522	1253	1546, 1494	1036	553	540	1781, 1743, 1466, 1384, 1306, 808
$(L^3)Er(NO_3)_2(OH)(H_2O)$ (XXXII)	3463	3343	1622	1580	1530	1250	1550, 1498	1044	549	532	1799, 1769, 1454, 1384, 1303, 816
$(L^3)Tm(NO_3)_3(CH_3OH)_3$ (XXXIII)	3454	3342	1618	1581	1522	1260	1558, 1493	1037	563	539	1785, 1740, 1466, 1384, 1309, 808
$(L^3)Yb(NO_3)_3(CH_3OH)$ (XXXIV)	3454	3342	1618	1580	1524	1261	1558, 1493	1038	554	540	1786, 1740, 1465, 1384, 1311, 809
$(L^3)LaCl_3(H_2O)_8$ (XXXV)	3458	3355	1622	1580	1522	1254	1547, 1529	1030	548	520	-
$(L^3)_2NdCl_3(H_2O)_8$ (XXXVI)	3457	3355	1622	1580	1529	1250	1547	1029	557	522	-
$(L^3)GdCl_3(H_2O)_7$ (XXXVII)	3458	3323	1620	1582	1524	1250	1546	1029	555	525	-
$(L^3)TbCl_3(H_2O)_7$ (XXXVIII)	3469	3331	1620	1582	1524	1250	1551	-	-	-	-
$(L^3)DyCl_3(H_2O)_8$ (XXXIX)	3481	3334	1621	1582	1526	1250	1551, 1486	1030	553	524	-
$(L^3)HoCl_3(H_2O)_8$ (XL)	3466	3368	1621	1579	1522	1255	1551, 1490	1029	551	524	-
$(L^3)ErCl_3(H_2O)_8$ (XLI)	3470	3379	1622	1582	1525	1253	1548, 1489	1029	550	526	-

Dodatkowo zaobserwowano, że pasma przy wartościach 1617 i 1577  $\text{cm}^{-1}$  pochodzące od pierścienia pirydynowego ligandu, w związkach kompleksowych ulegają przesunięciu w kierunku fal dłuższych o około 70  $\text{cm}^{-1}$  (Rysunek 63), co świadczy o obecności nowo powstałego wiązania koordynacyjnego pomiędzy atomem azotu pochodzącego z pierścienia pirydynowego a jonem lantanowca(III). [134]



Rysunek 63.

W przypadku związków kompleksowych zawierających anion azotanowy(V) znaleziono pasma absorpcji przy wartościach 1466-1299  $\text{cm}^{-1}$ . Wielkość rozczepienia tych pasm wynosi 146-160  $\text{cm}^{-1}$  i świadczy o obecności azotanów(V) związanych z jonem centralnym za pomocą dwóch atomów tlenu. [135] Wielkość rozszczepienia pasm absorpcji poszczególnych związków kompleksowych zawierających jony azotanowe(V) przedstawiono w tabeli 8.

Tabela 8.

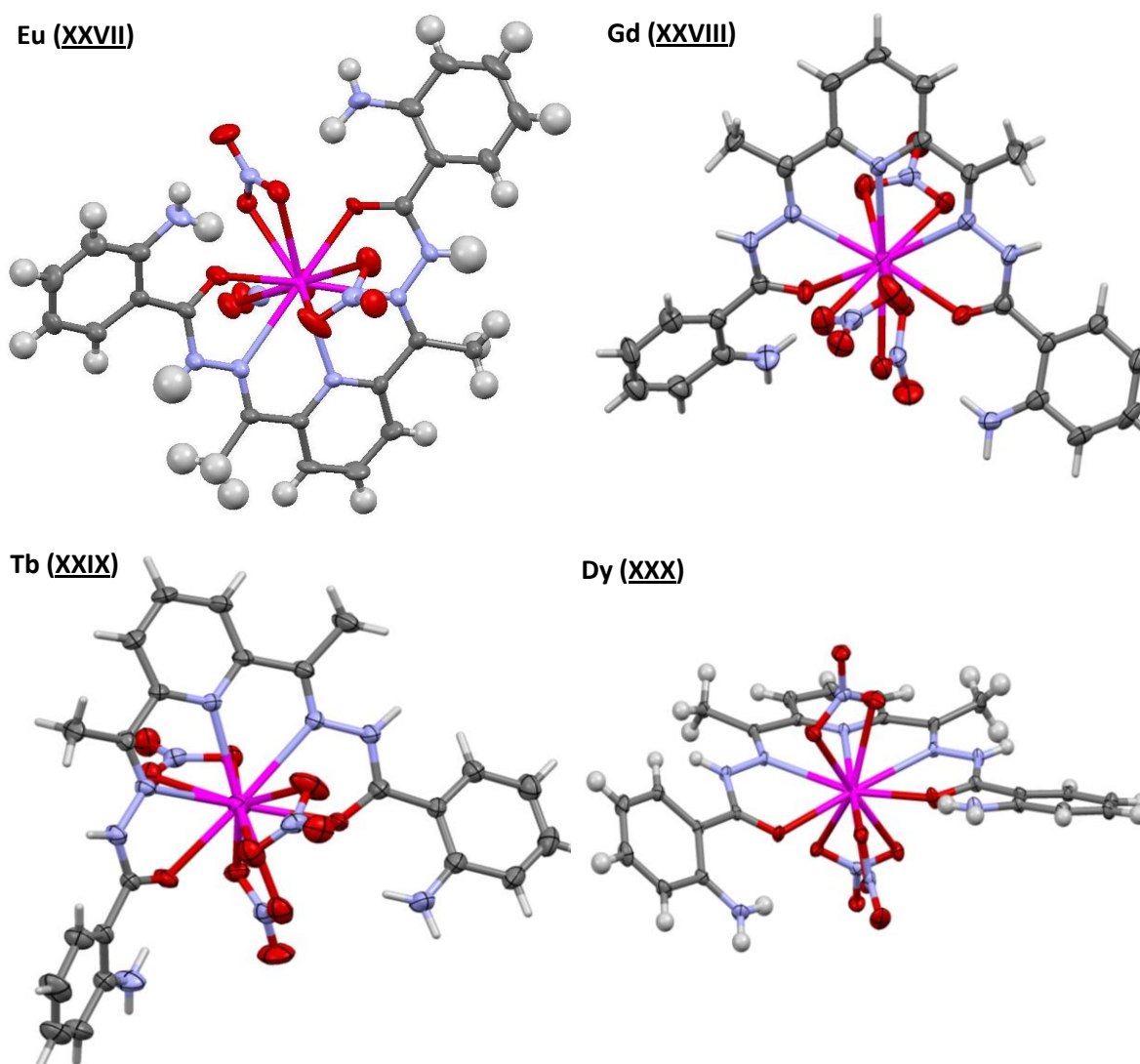
Związek kompleksowy	Wielkość rozszczepienia w zakresie 1799-1738 $\text{cm}^{-1}$	Wielkość rozszczepienia w zakresie 1466-1299 $\text{cm}^{-1}$
$(L^3)\text{La}(\text{NO}_3)_3(\text{H}_2\text{O})_2$ (XXIII)	31	146
$(L^3)\text{Pr}(\text{NO}_3)_3(\text{H}_2\text{O})_3$ (XXIV)	-	159
$(L^3)\text{Nd}(\text{NO}_3)_3(\text{CH}_3\text{OH})_2$ (XXV)	39	159
$(L^3)\text{Sm}(\text{NO}_3)_3(\text{H}_2\text{O})$ (XXVI)	38	147
$(L^3)\text{Eu}(\text{NO}_3)_3(\text{CH}_3\text{OH})$ (XXVII)	37	150

$(L^3)Gd(NO_3)_3(CH_3OH)$ (XXVIII)	41	149
$(L^3)Tb(NO_3)_3(CH_3OH)$ (XXIX)	29	152
$(L^3)Dy(NO_3)_2(CH_3OH)$ (XXX)	42	156
$(L^3)Ho(NO_3)_3(CH_3OH)$ (XXXI)	38	160
$(L^3)Er(NO_3)_2(OH)(H_2O)$ (XXXII)	30	151
$(L^3)Tm(NO_3)_3(CH_3OH)_3$ (XXXIII)	45	157
$(L^3)Yb(NO_3)_3(CH_3OH)$ (XXXIV)	46	154

Znaleziono pasma przy wartości 574-549 i 541-522  $cm^{-1}$ , które przypisano wiązaniom M-O i M-N.

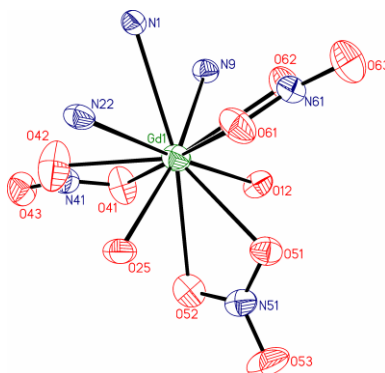
Dla związków kompleksowych  $(L^3)Eu(NO_3)_3(CH_3OH)(XXVII)$ ,  $(L^3)Gd(NO_3)_3(CH_3OH)(XXVIII)$ ,  $(L^3)Tb(NO_3)_3(CH_3OH)(XXIX)$ ,  $(L^3)Dy(NO_3)_2(CH_3OH)(XXX)$ ,  $(L^3)Er(NO_3)_2(OH)(H_2O)(XXXII)$  i  $(L^3)_2NdCl_3(H_2O)_8(XXXVI)$  ustalono strukturę krystaliczną za pomocą dyfrakcji promieni rentgenowskich.

Związki kompleksowe europu(III) (XXVII), gadolinu(III) (XXVIII), terbu(III) (XXIX) i dysprozu(III) (XXX) są izomorficzne (Rysunek 64). Mają stechiometrię metal-ligand 1:1 i liczbę koordynacyjną jedenaście. Ligand dostarcza pięciu atomów donorowych  $N_3O_2$ .



Struktury związków kompleksowych: Eu-XXVI; Gd-XXVIII; Tb-XXIX i Dy-XXX  
Rysunek 64.

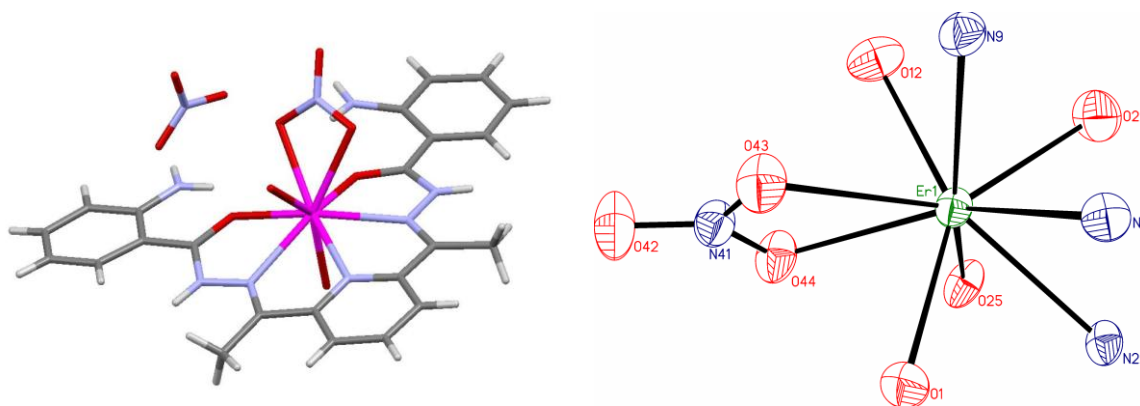
Wszystkie atomy donorowe pochodzące od ligandu znajdują się w jednej płaszczyźnie i zajmują pozycje ekwatorialne (Rysunek 65). W pozycjach aksjalnych znajdują się trzy dwukleszczowe aniony azotanowe(V).



Rysunek 65.

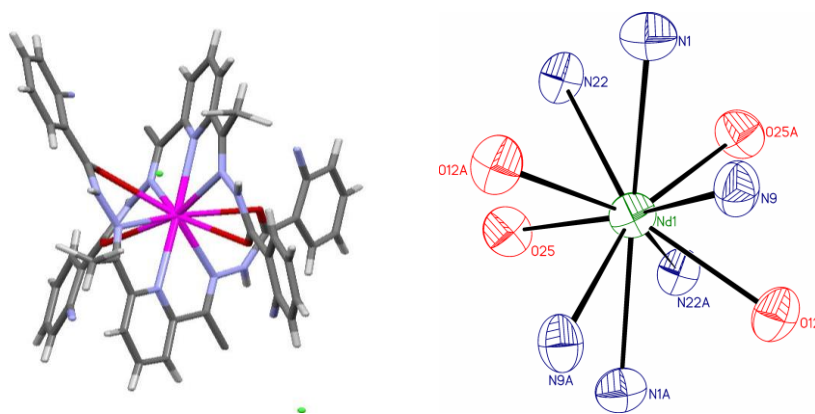
W reakcjach syntezy związków kompleksów, w których stosuje się uwodnione sole lantanowców(III) produktami często są hydroksykompleksy. Jony hydroksylowe powstają w wyniku hydrolizy zastosowanej soli lantanowca. Otrzymane kompleksy zawierają wówczas mieszane przeciwjony, zarówno aniony hydroksylowe jak i aniony pochodzące od zastosowanej soli.[136-138]

W skład sfery koordynacyjnej związku kompleksowego erbu(III) (XXXII) wchodzi  $\text{N}_3\text{O}_2^-$  donorowy ligand, jeden dwukleszczowy anion azotanowy(V), jedna cząsteczka wody i anion hydroksylowy, a liczba koordynacyjna wynosi 9 (Rysunek 66). Dodatkowo w zewnętrznej sferze koordynacyjnej znajduje się jeden anion azotanowy(V). Należy zaznaczyć, że warunki syntezy związku kompleksowego erbu(III) (XXXII) były takie same jak w przypadku związków kompleksowych XXVII-XXX.



Rysunek 66.

W wyniku reakcji templatowej dwóch cząsteczek 2,6-diacetylopirydyny i jednej cząsteczki 2-aminobenzoilohydrazidu w obecności chlorku neodymu(III) otrzymano związek kompleksowy XXXVI, w skład którego wchodzi dwie cząsteczki ligandu jeden jon neodymu(III) i dwa jony chlorkowe. Kompleks otrzymano w postaci kryształu, co pozwoliło na jednoznaczne określenie struktury krystalicznej (Rysunek 67).



Rysunek 67.

Liczba koordynacyjna jonu neodymu(III) w kompleksie XXXVI wynosi 10. Dwa atomy donorowe azotu pochodzące z pierścieni pirydynowych (dwa ligandy) i z wiązania iminowego (jeden ligand) znajdują się w pozycjach ekwatorialnych. Pozostałe atomy donorowe pochodzące od ligandów zajmują pozycje aksjalne. Dodatkowo poza sferą koordynacyjną znajdują się trzy jony chlorkowe, które równoważą ładunek jonu neodymu(III).

Dane krystalograficzne otrzymanych kryształów umieszczono w tabeli 9.

Tabela 9.

	XXVII	XXVIII	XXIX	XXX	XXXII	XXXVI
Wzór sumaryczny	$C_{24}H_{27}EuN_{10}O_{12}$	$C_{24}H_{27}GdN_{10}O_{12}$	$C_{24}H_{27}TbN_{10}O_{12}$	$C_{24}H_{27}DyN_{10}O_{12}$	$C_{23}H_{26}ErN_9O_{10}$	$C_{46}H_{62}NdN_{14}O_{12}Cl_3$
Masa	799,49	804,78	806,46	810,03	755,77	1253,67
Układ krystal.	jednoskośny	jednoskośny	jednoskośny	jednoskośny	trójskośny	rombowy
Grupa przestrzenna	$P2_1/n$	$P2_1/n$	$P2_1/n$	$P2_1/n$	P-1	Pcan
a(Å)	12.016(2)	12.018(5)	12.021(5)	12.0149(5)	8.0321(2)	13.4824(4)
b(Å)	15.780(2)	15.779(5)	15.787(5)	15.8003(6)	9.4437(3)	15.6908(4)
c(Å)	16.931(3)	16.916(5)	16.871(5)	6.8698(7)	20.6419(6)	25.6858(7)
$\alpha(^{\circ})$	-	-	-	-	85.436(2)	-
$\beta(^{\circ})$	110.78(2)	110.748(5)	110.647(5)	110.86(2)	79.319(2)	-
$\gamma(^{\circ})$	-	-	-	-	78.283(3)	-
$V(\text{\AA}^3)$	3001.4(2)	2999.8(18)	2996.1(18)	2992.6(2)	1505.13(7)	5433.8(3)
Z	4	4	4	4	2	4
$d_x(\text{g/cm}^3)$	1.76	1.77	1.78	1.79	1.70	1.50
$\mu(\text{mm}^{-1})$	15.67	2.29	2.44	2.58	2.86	9.21
Refleksy						
Zmierzone	14233	14648	8779	39979	38763	40289
Symetrycznie niezależne ( $R_{int}$ )	4965(0.117)	4908(0.033)	4941(0.022)	7279(0.056)	7341(0.055)	5478(0.138)

Związki kompleksowe zbadano spektrometrią masową ESI. Badania prowadzono w metanolu. Stwierdzono, że każdy związek kompleksowy zawierający ligand  $L^3$  w spektroskopii masowej ESI rozpada się na jon fragmentacyjny zawierający podwójnie deprotonowany ligand oraz jon lantanowca. W niektórych przypadkach występują jony fragmentacyjne zawierające ligand jednokrotnie deprotonowany, jon lantanowca oraz przeciwnon. Wyniki spektroskopii masowej ESI podano w Tabeli 10.

Tabela 10.

Związek kompleksowy	Kompleks	Pik	Jon fragmentacyjny
$(L^3)La(NO_3)_3(H_2O)_2$	(XXIII)	387	$[La(NO_3)_4]^-$
		429	$[C_{23}H_{22}N_7O_2]^-$
		566	$[C_{23}H_{21}N_7O_2]La^+$
		629	$[C_{23}H_{22}N_7O_2]La(NO_3)^+$
$(L^3)Pr(NO_3)_3(H_2O)_3$	(XXIV)	389	$[Pr(NO_3)_4]^-$
		568	$[C_{23}H_{21}N_7O_2]Pr^+$
		631	$[(C_{23}H_{22}N_7O_2)Pr(NO_3)]^+$
$(L^3)Nd(NO_3)_3(CH_3OH)_2$	(XXV)	571	$[C_{23}H_{21}N_7O_2]Nd^+$
		695-	$[(C_{23}H_{21}N_7O_2)Nd(NO_3)_2]^-$

$(L^3)Sm(NO_3)_3(H_2O)$	(XXVI)	578	$[C_{23}H_{21}N_7O_2)Sm]^+$
$(L^3)Eu(NO_3)_3(CH_3OH)$	(XXVII)	579	$[C_{23}H_{21}N_7O_2)Eu]^+$
$(L^3)Gd(NO_3)_3(CH_3OH)$	(XXVIII)	406	$[Gd(NO_3)_4]^-$
		587	$[C_{23}H_{21}N_7O_2)Gd]^+$
$(L^3)Tb(NO_3)_3(CH_3OH)$	(XXIX)	407	$[Tb(NO_3)_4]$
		586	$[C_{23}H_{21}N_7O_2)Tb]^+$
		649	$[(C_{23}H_{22}N_7O_2)Tb(NO_3)]^+$
$(L^3)Dy(NO_3)_3(CH_3OH)$	(XXX)	590	$[C_{23}H_{21}N_7O_2)Dy]^+$
$(L^3)Ho(NO_3)_3(CH_3OH)$	(XXXI)	414	$[Ho(NO_3)_4]$
		592	$[C_{23}H_{21}N_7O_2)Ho]^+$
		813	$[(C_{23}H_{22}N_7O_2)Ho(NO_3)_3(CH_3OH)]^-$
$(L^3)Er(NO_3)_2(OH)(H_2O)$	(XXXII)	594	$[C_{23}H_{21}N_7O_2)Er]^+$
$(L^3)Tm(NO_3)_3(CH_3OH)_3$	(XXXIII)	596	$[C_{23}H_{21}N_7O_2)Tm]^+$
		628	$[(C_{23}H_{21}N_7O_2)Tm(CH_3OH)]^+$
$(L^3)Yb(NO_3)_3(CH_3OH)$	(XXXIV)	601	$[C_{23}H_{21}N_7O_2)Yb]^+$
		660	$[C_{23}H_{21}N_7O_2)Yb(NO_3)]$
$(L^3)LaCl_3(H_2O)_8$	(XXXV)	566	$[C_{23}H_{21}N_7O_2)La]^+$
		602	$[C_{23}H_{22}N_7O_2)LaCl]^+$
		636	$[C_{23}H_{21}N_7O_2)LaCl_2]^-$
$(L^3)NdCl_3(H_2O)_8$	(XXXVI)	571	$[C_{23}H_{21}N_7O_2)Nd]^+$
		607	$[C_{23}H_{22}N_7O_2)NdCl]^+$
		643	$[C_{23}H_{21}N_7O_2)NdCl_2]$
$(L^3)GdCl_3(H_2O)_7$	(XXXVII)	587	$[C_{23}H_{21}N_7O_2)Gd]^+$
		619	$[C_{23}H_{22}N_7O_2)GdCl]^+$
		655	$[C_{23}H_{21}N_7O_2)GdCl_2]$
$(L^3)TbCl_3(H_2O)_7$	(XXXVIII)	586	$[C_{23}H_{21}N_7O_2)Tb]^+$
		618	$[C_{23}H_{22}N_7O_2)TbCl]^+$
$(L^3)DyCl_3(H_2O)_8$	(XXXIX)	590	$[C_{23}H_{21}N_7O_2)Dy]^+$
		623	$[C_{23}H_{22}N_7O_2)DyCl]^+$
		661	$[C_{23}H_{21}N_7O_2)DyCl_2]^-$
$(L^3)HoCl_3(H_2O)_8$	(XL)	592	$[C_{23}H_{21}N_7O_2)Ho]^+$
		624	$[C_{23}H_{22}N_7O_2)HoCl]^+$
		661	$[C_{23}H_{21}N_7O_2)HoCl_2]$
$(L^3)ErCl_3(H_2O)_8$	(XLI)	590	$[C_{23}H_{21}N_7O_2)Er]^+$
		652	$[C_{23}H_{21}N_7O_2)ErCl+Na^+]^+$
		689	$[(C_{23}H_{21}N_7O_2)ErCl_2+Na^+]$



Otrzymano nowe związki kompleksowe lantanowców zawierające hydrazonową zasadę Schiffa 2,6-diacetylopirydyno-bis(2-aminobenzoilohydrazon) (ligand  $L^3$ ). W związkach kompleksowych europu(III) (XXVII), gadolinu(III) (XXVIII), terbu(III) (XXIX) i dysprozu(III) (XXX) liczba koordynacyjna wynosi 11 - tak wysoka liczba koordynacyjna w związkach kompleksowych lantanowców występuje rzadko.[139-141]

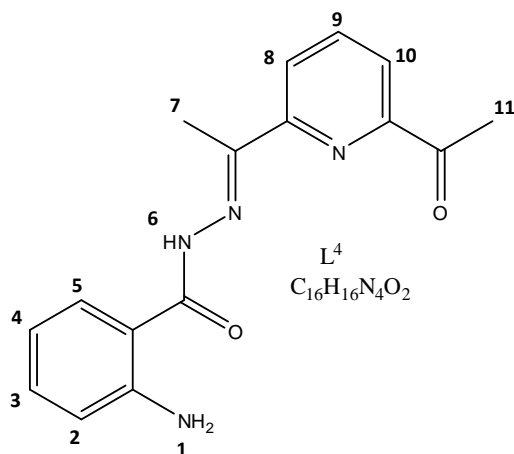
Podjęto próby otrzymania związków kompleksowych lantanowców z ligandem  $L^3$  metodą bezpośrednią. Otrzymano takie same kompleksy jak w przypadku zastosowania metody templatowej, jednak o mniejszej czystości. Dodatkowo w przypadku metody templatowej otrzymano związki kompleksowe w postaci kryształów, a to pozwoliło na określenie struktury krystalicznej metodą dyfrakcji promieni rentgenowskich, to znaczy na jednoznaczne ustalenie sfery i liczby koordynacyjnej.

Analizie poddano także wszystkie osady wypadające z przesączy. W żadnym przypadku nie uzyskano pozytywnych rezultatów.

## 2.2 Związki kompleksowe lantanowców(III) z 2,6-diacetylopirydino-(2-aminobenzoilohydrazonem) ( $L^4$ )

Podczas próby otrzymania 2,6-diacetylopirydino-bis(2-aminobenzoilohydrazonu) ligandu  $L^3$  produktu kondensacji dwóch cząsteczek 2-aminobenzoilohydrazynu i jednej cząsteczki 2,6-diacetylopirydyny, wyizolowano dwa produkty reakcji, z których jednym jest 2,6-diacetylopirydino-bis(2-aminobenzoilohydrazon) – ligand  $L^3$ , a drugim 2,6-diacetylopirydino-(2-aminobenzoilohydrazon) – ligand  $L^4$  (Rysunek 68), produkt kondensacji jednej cząsteczki 2-aminobenzoilohydrazynu z jedną cząsteczką 2,6-diacetylopirydyny. Otrzymany jako produkt uboczny 2,6-diacetylopirydino-(2-aminobenzoilohydrazon) – ligand  $L^4$  postanowiono wykorzystać w syntezie kompleksów lantanowców(III) metodą bezpośrednią.

Kompleksy z 2,6-diacetylopirydino-(2-aminobenzoilohydrazonem) ( $L^4$ ) otrzymano w syntezie bezpośredniej ligandu z azotanami(V) lub chlorkami odpowiednich lantanowców(III).



Rysunek 68.

Osady oraz osady z przesączy scharakteryzowano metodami analitycznymi (analiza elementarna) i spektralnymi (spektroskopia w podczerwieni, spektroskopia masowa ESI). Wyznaczenie temperatury topnienia oraz określenie sfery koordynacyjnej za pomocą analizy termogravimetrycznej było niemożliwe ze względu na gwałtowny rozpad związków kompleksowych w wyższych temperaturach.

Wyniki analizy elementarnej (Tabela 11) wskazują, że w przypadku zastosowania azotanowych(V) soli lantanowców(III) otrzymano dwa rodzaje kompleksów. W reakcjach, w których osady wypadały po około 3 minutach od wprowadzenia wszystkich reagentów, otrzymano związki kompleksowe, w których stosunek ligandu do metalu wynosił 1:1. W sytuacjach, w których osady wypadały po dłuższym czasie niż 4-5 godzin, w otrzymanych kompleksach stosunek ligandu:metalowi wynosił 3:2. Przy zastosowaniu chlorkowych soli lantanowców(III) otrzymano związki kompleksowe, w których stosunek ligandu do metalu wynosi 1:1.

Tabela 11. Analiza elementarna

Związek kompleksowy	Analiza elementarna					
	Otrzymano			Obliczono		
	C%	H%	N%	C%	H%	N%
(L <sup>4</sup> )	64,29	5,62	19,24	64,85	5,44	18,91
(L <sup>4</sup> ) <sub>3</sub> La <sub>2</sub> (NO <sub>3</sub> ) <sub>6</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>7</sub> (XLII)	32,46	3,73	16,33	34,63	3,75	16,69
(L <sup>4</sup> )Pr(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>2</sub> (XLIII)	30,76	3,36	15,04	29,15	3,06	14,87
(L <sup>4</sup> ) <sub>3</sub> Pr <sub>2</sub> (NO <sub>3</sub> ) <sub>6</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>2</sub> (XLIIIa)	34,10	3,40	17,17	36,51	3,32	15,97
(L <sup>4</sup> ) <sub>3</sub> Nd <sub>2</sub> (NO <sub>3</sub> ) <sub>6</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>3</sub> (XLIV)	33,19	3,35	15,97	35,95	3,39	15,72
(L <sup>4</sup> )Sm(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> (CH <sub>3</sub> OH) (XLV)	32,43	2,97	16,08	30,72	3,03	14,75
(L <sup>4</sup> ) <sub>3</sub> Gd <sub>2</sub> (NO <sub>3</sub> ) <sub>6</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>2</sub> (XLVI)	32,38	3,04	16,21	35,77	3,25	15,64
(L <sup>4</sup> )Yb(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>2</sub> (XLVII)	30,68	3,02	14,69	27,79	2,92	14,18
(L <sup>4</sup> ) <sub>3</sub> Yb <sub>2</sub> (NO <sub>3</sub> ) <sub>6</sub> (H <sub>2</sub> O) (XLVIIa)	35,60	3,36	16,10	35,48	3,10	15,51
(L <sup>4</sup> )LaCl <sub>3</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>4</sub> (XLVIII)	33,10	4,20	9,44	31,32	3,94	9,13
(L <sup>4</sup> )GdCl <sub>3</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>2</sub> (XLIX)	33,57	3,58	9,61	32,25	3,38	9,40
(L <sup>4</sup> )ErCl <sub>3</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>2</sub> (L)	32,72	3,53	9,81	31,71	3,33	9,25
(L <sup>4</sup> )YbCl <sub>3</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>2</sub> (LI)	32,07	3,43	9,51	31,41	3,30	9,16

W widmie spektroskopii w podczerwieni ligandu  $L^4$  zaobserwowano pasma absorpcji przy wartości 1701 i 1658  $\text{cm}^{-1}$ , które przypisano odpowiednio wiązaniu amidowemu (C=O) i iminowemu (C=N). W związkach kompleksowych pasma te ulegają przesunięciu w kierunku liczby falowej o mniejszej wartości o 10-48  $\text{cm}^{-1}$  w przypadku wiązania C=O i o 29-40  $\text{cm}^{-1}$  w przypadku wiązania C=N. Przesunięcie pasm absorpcji świadczy o zaangażowaniu atomów donorowych tlenu pochodzącego z grupy amidowej i azotu z grupy iminowej w tworzeniu wiązania koordynacyjnego z jonem lantanowca(III).[142,143] Dodatkowo zaobserwowano pasma pochodzące od pierścienia pirydynowego, przy wartościach 1617 i 1577  $\text{cm}^{-1}$ . W związkach kompleksowych pasma te ulegają przesunięciu w kierunku fal dłuższych o około 30  $\text{cm}^{-1}$ . Oznacza to, że atom donorowy azotu z pierścienia pirydynowego koordynuje z jonem centralnym.[144] W przypadku związków kompleksowych zawierających jony azotanowe(V) zaobserwowano rozszczerzone pasma w zakresie 1786-1729  $\text{cm}^{-1}$ , 1493-1282 $\text{cm}^{-1}$ . Wielkość rozszczerzenia sugeruje obecność jonów azotanowych(V) dwukleszczowych.[145-147] Dodatkowo zaobserwowano pasmo przy wartości 1383, 1384 $\text{cm}^{-1}$  mogące świadczyć o obecności jonowych azotanów(V). Pasma przy wartościach 561-547 $\text{cm}^{-1}$  i 531-522 $\text{cm}^{-1}$  przypisano odpowiednio drganiom wiązań metal-tlen, metal-azot. Dane dla wszystkich kompleksów zawierających ligand  $L^4$  zamieszczono w tabeli 12.

Tabela 12. Pasma absorpcji w podczerwieni ( $\text{cm}^{-1}$ )

Wzór kompleksu	NH <sub>2</sub>		C=O I amid	C=N	C=C	II amid	III amid	N-N	M-O	M-N	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>
	$\nu_{\text{as}}$	$\nu_{\text{s}}$									
L <sup>4</sup>	3460	3347	1701	1658	1617, 1577	1533	1308	997, 992, 986	-	-	-
(L <sup>4</sup> ) <sub>3</sub> La <sub>2</sub> (NO <sub>3</sub> ) <sub>6</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>7</sub> (XLII)	3478	3371	1678	1629	1586, 1529	1554	1251	1046, 1033,	548	527	1762, 1738, 1458, 1384, 1299, 816
(L <sup>4</sup> )Pr(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>2</sub> (XLIII)	3478	3372	1678	1628	1585, 1534	1554	1250	1047, 1034	547	531	1765, 1738, 1475, 1384, 1300, 820
(L <sup>4</sup> ) <sub>3</sub> Pr <sub>2</sub> (NO <sub>3</sub> ) <sub>6</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>2</sub> (XLIIIa)	3482	3372	1680	1629	1586, 1528	1554	1251	1033, 1006	551	527	1769, 1738, 1459, 1384, 1299, 816
(L <sup>4</sup> ) <sub>3</sub> Nd <sub>2</sub> (NO <sub>3</sub> ) <sub>6</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>3</sub> (XLIV)	3478	3370	1674	1629	1586, 1527	1553	1250	1032, 1006	550	528	1769, 1738, 1488, 1384, 1299, 816
(L <sup>4</sup> )Sm(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> (CH <sub>3</sub> OH) (XLV)	3496	3370	1672	1629	1585, 1514	1546	1248	1029, 1007	559	526	1772, 1729, 1489, 1384, 1282, 815
(L <sup>4</sup> ) <sub>3</sub> Gd <sub>2</sub> (NO <sub>3</sub> ) <sub>6</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>2</sub> (XLVI)	3496	3369	1673	1629	1586, 1510	1547	1247	1033, 1030	559	525	1785, 1730, 1460, 1384, 1284, 815
(L <sup>4</sup> )Yb(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>2</sub> (XLVII)	3494	3385	1670	1628	1584, 1511	1547	1250	1038, 1031	561	522	1785, 1734, 1492, 1384, 1292, 813
(L <sup>4</sup> ) <sub>3</sub> Yb <sub>2</sub> (NO <sub>3</sub> ) <sub>6</sub> (H <sub>2</sub> O) (XLVIIa)	3453	3385	1674	1618	1583, 1523	1557	1260	1046, 1037	554	522	1786, 1740, 1493, 1383, 1308, 809
(L <sup>4</sup> )LaCl <sub>3</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>4</sub> (XLVIII)	3440	3307	1671	1626	1583, 1517	1547	1249	1019, 1005	551	527	-

# OMÓWIENIE WYNIKÓW

$(L^4)GdCl_3(H_2O)_2$ (XLIX)	3465	3349	1666	1628	1582, 1518	1548	1251	1042, 1029, 1012	550	524	-
$(L^4)ErCl_3(H_2O)_2$ (L)	3454	3335	1656	1626	1580, 1520	1545	1253	1015	553	525	-
$(L^4)YbCl_3(H_2O)_2$ (LI)	3454	3337	1653	1628	1580, 1520	1546	1254	1015	554	525	-

Badania spektrometrią masową ESI wykonywano w metanolu. Na podstawie wyników spektroskopii masowej ESI ustalono, że wszystkie związki kompleksowe zawierają zasadę Schiffa  $L^4$  rozpadają się na jony fragmentacyjne. W większości przypadków zaobserwowano jon fragmentacyjny składający się z jonu metalu skoordynowanego z ligandem i jonom azotanowym(V) lub chlorkowym. Wyniki zostały przedstawione w tabeli 13.

Tabela 13.

Związek kompleksowy	Kompleks	Pik	Jon fragmentacyjny
$L^4$		297	$(HL^4)^+$
		319	$(HL^4 + Na^+)^+$
$(L^4)_3La_2(NO_3)_6(H_2O)_7$	(XLII)	496	$[(L^4)^-La(NO_3)]^+$
		557	$[(L^4)^-La(NO_3)_2]$
		620	$[(L^4)^-La(NO_3)_3]^-$
		729	$[(L^4)_2^-La]^+$
$(L^4)Pr(NO_3)_3(H_2O)_2$	(XLIII)	498	$[(L^4)^-Pr(NO_3)]^+$
		559	$[(L^4)^-Pr(NO_3)_2]$
		731	$[(L^4)_2^-Pr]^+$
$(L^4)_3Pr_2(NO_3)_6(H_2O)_2$	(XLIIIa)	568	$[(L^4)^-Pr(NO_3)_2]^+ (561)$
$(L^4)_3Nd_2(NO_3)_6(H_2O)_3$	(XLIV)	660	$[(L^4)^-Nd(NO_3)_3(H_2O)_2]^-$
$(L^4)Sm(NO_3)_3(CH_3OH)$	(XLV)	-	
$(L^4)_3Gd_2(NO_3)_6(H_2O)_2$	(XLVI)	-	
$(L^4)Yb(NO_3)_3(H_2O)_2$	(XLVII)	592	$[(L^4)^-Yb(NO_3)_2]$
		764	$[(L^4)_2^-Yb]^+$
$(L^4)_3Yb_2(NO_3)_6(H_2O)$	(XLVIIa)	534	$[(L^4)^-Yb(NO_3)]^+ (561)$
$(L^4)LaCl_3(H_2O)_4$	(XLVIII)	729	$[(L^4)_2^-La]^+$
$(L^4)GdCl_3(H_2O)_2$	(XLIX)	-	
$(L^4)ErCl_3(H_2O)_2$	(L)	496	$[(L^4)^-ErCl]^+$
		532	$[(L^4)^-ErCl_2]$
		570	$[(L^4)^-ErCl_3]^-$
$(L^4)YbCl_3(H_2O)_2$	(LI)	490	$[(L^4)^-YbCl]^+$

Związki kompleksowe zawierające 2,6-diacetylopirydyno-(2-aminobenzoilohydrazon) – ligand  $L^4$  otrzymano metoda bezpośrednią. Dowiedziono także, że jest to jedyna metoda umożliwiająca otrzymanie tych związków, gdyż próby otrzymania związków kompleksowych zawierających ligand  $L^4$  metodą templatową (reakcje kondensacji *in situ*) niezależnie od stosowanych stosunków substratów, zawsze prowadziły do otrzymania związków kompleksowych zawierających 2,6-diacetylopirydyno-bis(2-aminobenzoilohydrazon) – ligand  $L^3$ . Może to świadczyć o dogodniejszym ułożeniu atomów donorowych w ligandzie 2,6-diacetylopirydyno-bis(2-aminobenzoilohydrazonowym)  $L^3$  powstającym w wyniku samoorganizacji. Przemawia za tym wyizolowanie takich kompleksów w postaci kryształów.

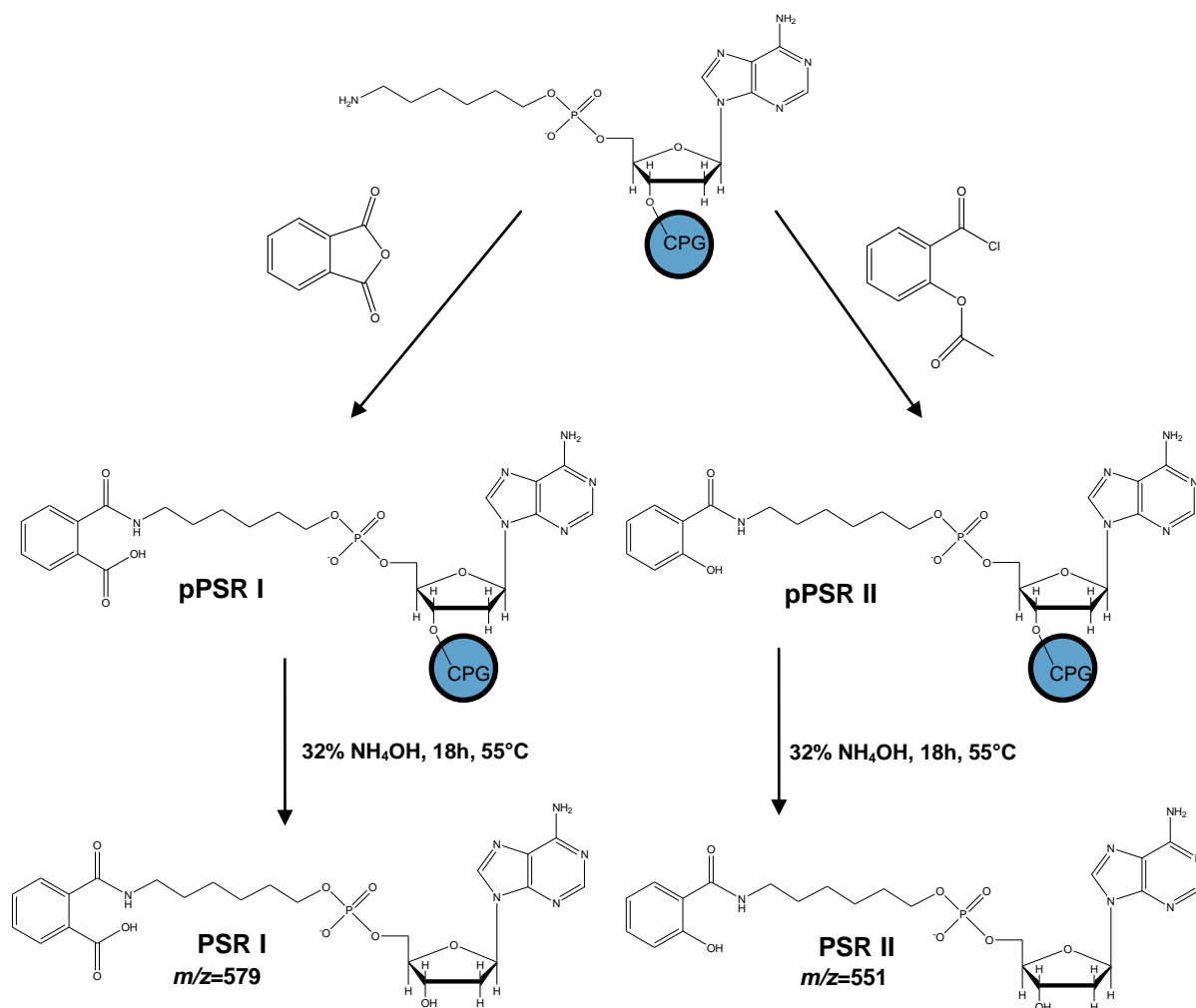


### 3. Syntetyczne rybonukleazy

#### 3.1 Badania wstępne

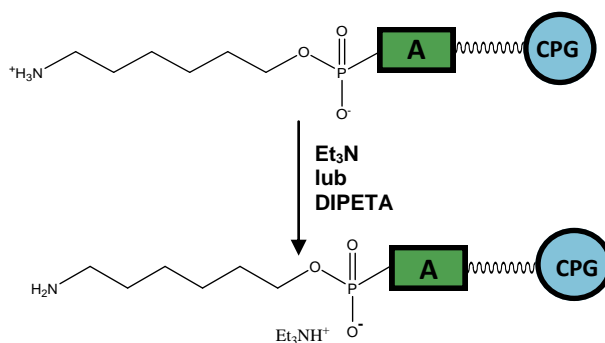
Badania wstępne miały na celu znalezienie i opracowanie najlepszej metody syntezy prekursorów syntetycznych rybonukleaz **PSR**, rozumianych jako 2'-O-metylowane oligonukleotydy (2'OMe RNA) zawierające na końcu 5' ligand z donorowymi atomami tlenu i azotu. Nakierowane były one na przyłączanie bezwodnika kwasu ftalowego, chlorku O-acetylosalicylowego, kwasu O-acetylosalicylowego do odpowiednio modyfikowanego nukleozydu lub nukleotydu. Jako modyfikowany prekursor (nukleozyd lub nukleotyd) należy rozumieć adenozyne, DNA lub 2'OMe RNA zawierający na końcu 5' łącznik 6-aminoheksylowy. O ile pozwalały na to właściwości chemiczne danej grupy (odporność na warunki odblokowania), korzystne było przyłączenie liganda na prekursorze wciąż połączonym z podłożem CPG. Upraszcza to procedurę oczyszczania.

W wyniku reakcji adenozyiny przyłączonej do podłoża CPG (zawierającej w pozycji 5' łącznik 6-aminoheksylowy) z bezwodnikiem kwasu ftalowego lub chlorkiem O-acetylosalicylowym otrzymano nukleozydy **PSR I** lub **PSR II** (Rysunek 69). Reakcje RI i RI' prowadzono w temperaturze pokojowej w pirydynie. Produkty **pPSR I** lub **pPSR II** odcięto od podłoża CPG i oczyszczono na analitycznych płytkach TLC. W widmach spektrometrii masowej MALDI i ESI zaobserwowano piki przy wartościach m/z 579 i 551 odpowiadające odpowiednio nukleotydom **PSR I** i **PSR II**. Stwierdzono, że w każdej z przeprowadzonych reakcji otrzymano oczekiwany produkt **PSR I** lub **PSR II**. Wydajność prowadzonych reakcji wynosiła około 70-80%.



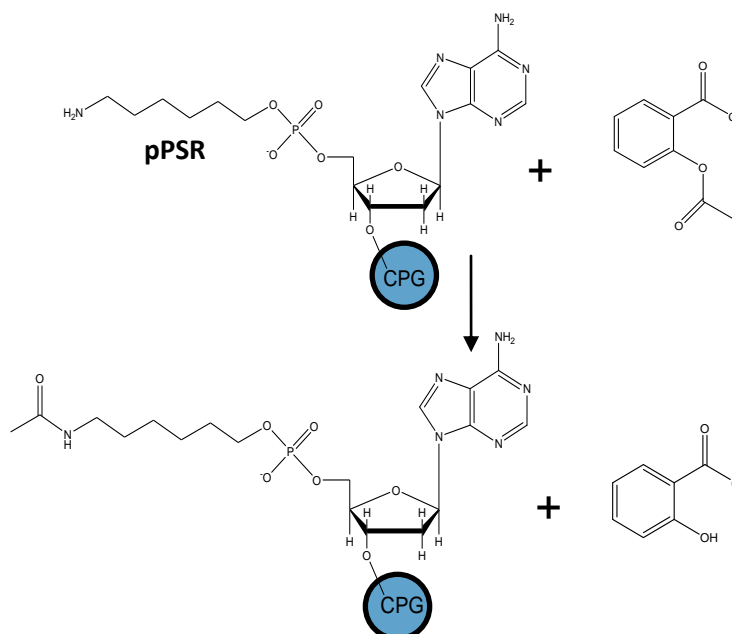
Schemat syntezy prekursorów syntetycznej rybonukleazy **PSR I** i **II**  
Rysunek 69.

Seria opisanych reakcji (patrz rozdział 4.3 str. 64) miała prowadzić do zwiększenia wydajności. W wyniku podwyższenia temperatury i zmiany stosunku reagentów w reakcjach **RII** i **II'** nie stwierdzono zwiększenia wydajności w porównaniu z reakcjami **RI** i **I'**. Przypuszczano, że wydajność powyższych reakcji związana jest ze strukturą jonu obojnaczego reszty 5'-aminoheksylo-fosforanowej (Rysunek 70). W tego typu zwitterjonie grupa aminowa jest sprotonowana, co znacznie obniża jej reaktywność jako nukleofila. Założono, że dodanie zasady np. trietyloaminy ( $\text{Et}_3\text{N}$ ) lub diizopropylloaminy (DIPETA) spowoduje przekształcenie struktury zwitterjonu w parę jonową: kation  $\text{Et}_3\text{NH}^+$  lub  $\text{DIPETAH}^+$  i anion fosforanowy, w którym grupa aminowa reszty 5'-aminoheksylowej nie będzie protonowana.



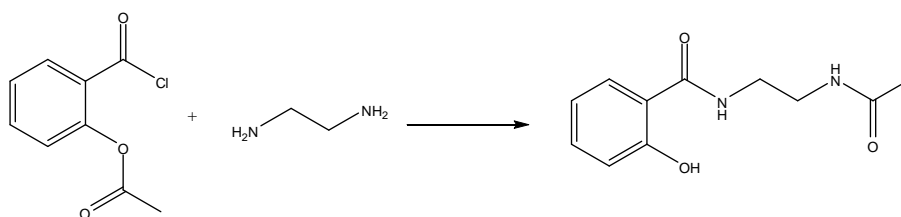
Tworzenie się pary jonowej: kationu  $\text{Et}_3\text{NH}^+$  lub  $\text{DIPETAH}^+$  z anionem fosforanowego  
Rysunek 70.

W związku z tym przeprowadzono reakcję **RIII**, **III'** i **RIV**, **IV'** (w przypadku reakcji **RIV** i **IV'** zastosowano tylko inny rozpuszczalnik) z dodatkiem  $\text{Et}_3\text{N}$  mającej zdeprotonować grupę aminową i zwiększyć wydajność prowadzonych reakcji. Podobnie jak w przypadku reakcji **RII** i **II'** i tym razem nie stwierdzono zwiększenia wydajności. Zastosowanie silniejszej zasady DIPETA również nie przyniosło zwiększenia wydajności - reakcje **RV**, **V'** i **RVI**, **VI'** (w przypadku reakcji **RVI** i **VI'** zastosowano tylko inny rozpuszczalnik). Po wnikliwej analizie widm masowych MALDI stwierdzono że na zmniejszenie wydajności reakcji, w których użyto chlorek O-acetylosalicylowy, wpływa reakcja uboczna (Rysunek 71), co jednocześnie nie dyskwalifikuje założenia o wpływie protonacji grupy aminowej w reszcie 5'-aminoheksylo-fosforanowej na wydajność reakcji.



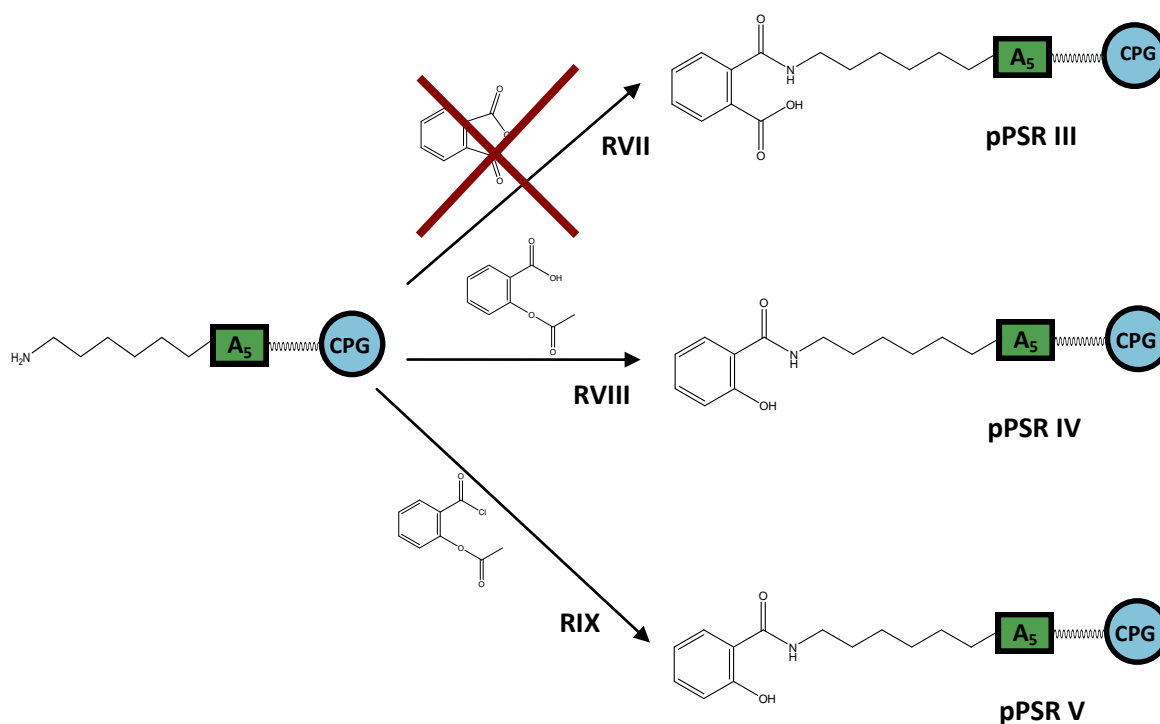
Schemat tworzenia się produktu ubocznego  
Rysunek 71.

W trakcie podejmowanych prób otrzymania amidu 2-aminoetylo-*O*-acetylosalicylowego, wyizolowano kryształy nowego związku *N*-[2-(acetamido)etylo]-2-hydroksybenzamid, dla którego ustalono jednoznacznie strukturę krystaliczną. Dowiedziono, że acetylowa grupa blokująca grupę 2-hydroksylową w pierścieniu benzylovym, podczas reakcji przechodzi na wolną grupę aminową, tworząc trwały acetamid (Rysunek 72).[148]



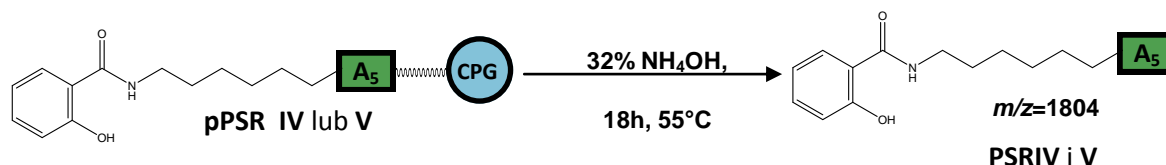
Schemat syntezy *N*-[2-(acetamido)etylo]-2-hydroksybenzamidu  
Rysunek 72.

Dzięki uzyskaniu pozytywnych rezultatów w reakcjach **RI-II** postanowiono przeprowadzić podobne reakcje na pentametrze 5'-(6-aminoheksylo)-2'-deoksyadenozyny **RVII-RIX** (Rysunek 73).



Schemat syntezy prekursorów syntetycznej rybonukleazy **PSR III-V** na podłożu CPG  
Rysunek 73.

Uzyskane produkty **pPSR III, IV i V** odcięto od podłoża CPG (Rysunek 74), oczyszczono na analitycznych płytkach TLC i wykonano widma spektrometrii masowej MALDI. W wyniku reakcji **RVIII i RIX** otrzymano ten sam produkt, co potwierdziły wyniki spektrometrii masowej MALDI, w widmach której zaobserwowano piki przy wartości  $m/z$  1804 odpowiadające oligonukleotydowi **PSR IV i V**. W przypadku reakcji **RVII**, w której zastosowano bezwodnik kwasu ftalowego, nie otrzymano oczekiwanych rezultatów.



Schemat odcięcia **pPSR IV i V** od podłoża CPG  
Rysunek 74.

Za zmniejszenie wydajności reakcji odpowiedzialna jest uboczna reakcja przebiegająca w ten sam sposób jak w przypadku 2'-deoksyadenozyny (Rysunek 71). W wyniku tej reakcji tworzy się trwały amid acetylowy na grupie 5'-aminoheksylowej (MALDI  $m/z=1548$ ). Na wydajność reakcji ma wpływ również protonacja grupy aminowej w reszcie 5'-aminoheksylowej. Stwierdzono, że żadna z przeprowadzonych reakcji nie zwiększyła wydajności, dlatego postanowiono przeprowadzić doświadczenia na nukleotydzie docelowym.

### 3.2 Badania docelowe

Badania docelowe polegały na stworzeniu syntetycznej rybonukleazy (zawierającej w swej strukturze jon lantanowca(III)), która mogłaby być w późniejszym czasie i przy dogłębszych badaniach zastosowana w leczeniu choroby Machado-Josepha (MJD) (ataksja rdzeniowo-mózdkowa typu 3) lub innych chorób człowieka.[149-152] Choroba ta należy do grupy neurodegeneracyjnych chorób genetycznych objawiających się zaburzeniami koordynacji ruchowej, spowodowanej zmianami w obrębie mózdku. Część tych zmian należy do chorób spowodowanych

ekspansją trinukleotydów. W przypadku MJD polega na powieleniu fragmentu genu (RNA) o sekwencji CAG (kodon oznaczający aminokwas glutaminę). Liczba powieleń trinukleotydów CAG dla osób zdrowych waha się w przedziale od 13 do 36, natomiast u osób u których stwierdzono chorobę MJD wynosi ona od 62 do 84.[153]

W tym celu zsyntezowano RNA o sekwencji CAG CAG CAG CGG GAC CUA oraz komplementarny do niego 2'OMe RNA zawierające na końcu 5' łącznik 6-aminoheksylowy.

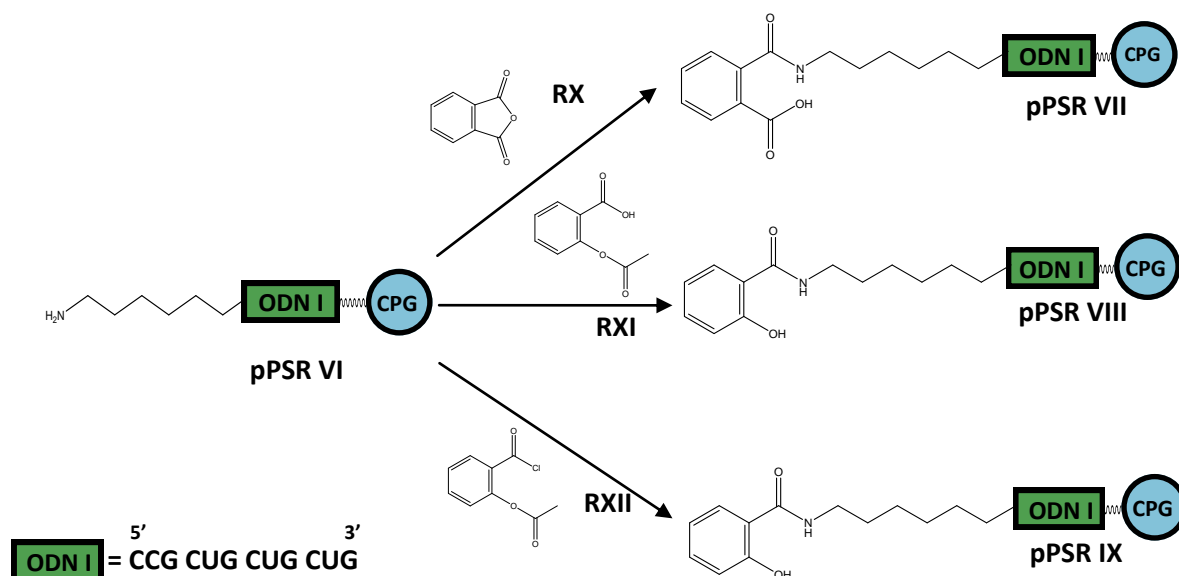
Zsyntezowano także 2'-OMe RNA zawierający na końcu 5' wolną grupę aminową:

#### PSR VI



Zsyntezowany 2'OMe RNA jest komplementarny z fragmentem RNA pomiędzy 1-12 nukleotydem.

W celu stworzenia miejsca koordynacji jonu lantanowca z oligonukleotydem **PSR VI** przeprowadzono reakcje **RX**, **XI** i **XII** (Rysunek 75). Produkty reakcji odcięto od podłoża CPG, oczyszczono na analitycznych płytkach TLC i wykonano widma MALDI.



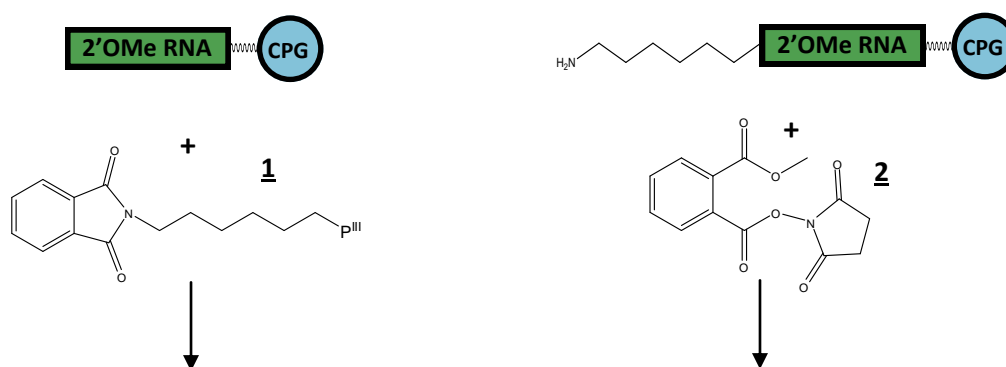
Schemat syntezy prekursorów syntetycznej rybonukleazy **PSR VII-IX** na podłożu CPG  
Rysunek 75.

W widmach spektrometrii masowej MALDI nie zaobserwowano pików pochodzących od żądanych produktów reakcji. W żadnej z przeprowadzonych reakcji nie uzyskano pozytywnego rezultatu. Stwierdzono, że produkty reakcji **RIX-XI** rozpadają się

prawdopodobnie podczas oczyszczania na analitycznych płytkach TLC. W tym celu przeprowadzono reakcje ponownie i oczyszczono za pomocą chromatografii HPLC.

Rozdzielone nukleotydy przekazano do spektrometrii masowej MALDI. Ponownie nie uzyskano pozytywnych rezultatów. Stwierdzono, że na trwałość wiązania amidowego może mieć wpływ środowisko reakcji odcięcia oligonukleotydu od podłoża stałego CPG. W tym celu przeprowadzono reakcje odcięcia od podłoża przed przeprowadzeniem reakcji kondensacji, a produkty oczyszczono za pomocą HPLC. Ponownie nie uzyskano pozytywnych rezultatów.

Postanowiono zmienić sposób przyłączania ligandu organicznego do końca 5' nukleotydu 2'OMe RNA. Dokonano tego dwoma sposobami (Rysunek 76).

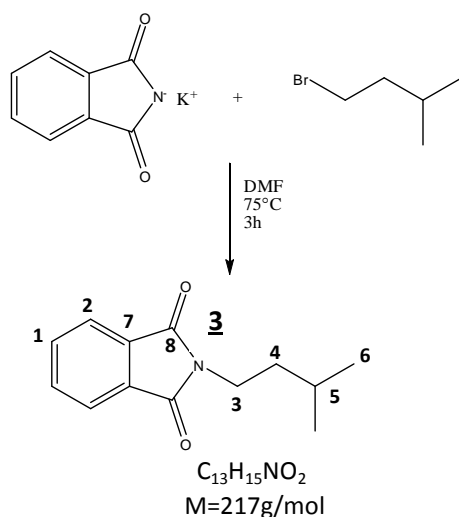


Sposób przyłączania ligandu organicznego do końca 5' nukleotydu 2'OMe RNA

Rysunek 76.

Pierwszy z nich polegał na wcześniejszym zsyntezowaniu fosforynu (**1**), który następnie przyłączano na syntezaorze do końca 5' 2'OMe RNA w oparciu o chemię amidofosforynową. Drugi polegał na zsyntezowaniu ftalowego estru aktywnego (**2**) i następnie połączeniu go z grupą aminową na końcu 5' 2'OMe RNA. Wykonano badania wstępne mające na celu sprawdzenie najlepszego sposobu odcięcia prekursora syntetycznej rybonukleazy od podłoża przy doprowadzeniu jednocześnie do otwarcia pierścienia imidowego. W tym celu zsyntezowano prosty analog związków fosforynu i estru aktywnego.

W wyniku reakcji ftalimidku potasu z 1-bromo-3-metylobutanem otrzymano 3-metylo-1-ftalimidobutan (**3**) (Rysunek 77), który scharakteryzowano metodami spektroskopowymi ( $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$  i spektrometrią masową ESI).



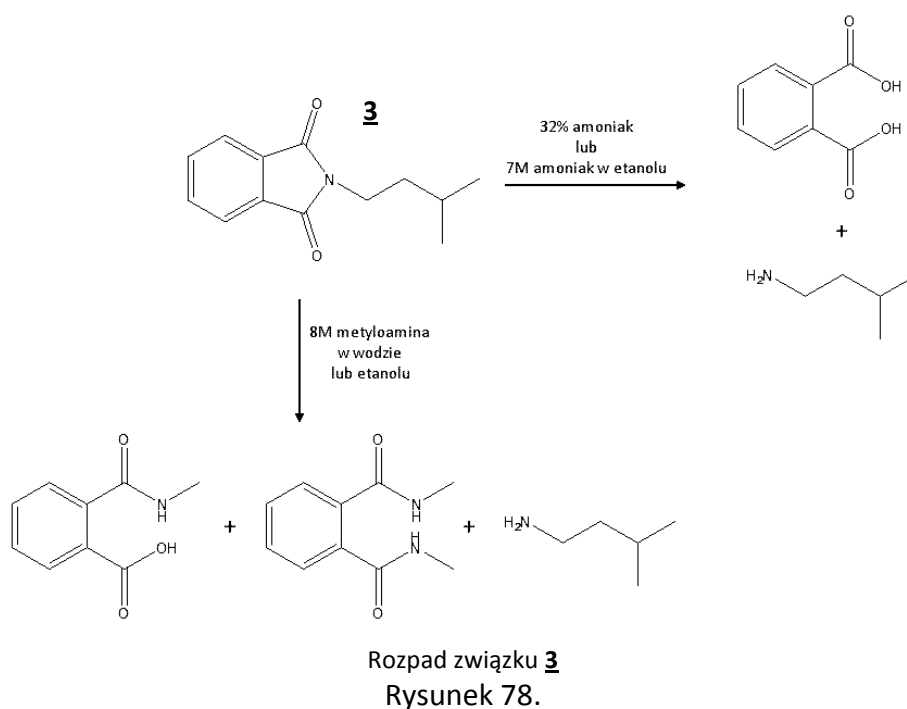
Schemat syntezy związku **3**  
Rysunek 77.

W spektrometrii masowej ESI znaleziono pik przy wartości  $m/z = 240$  odpowiadający  $[\text{C}_{13}\text{H}_{15}\text{NO}_2 + \text{Na}^+]^+$ .

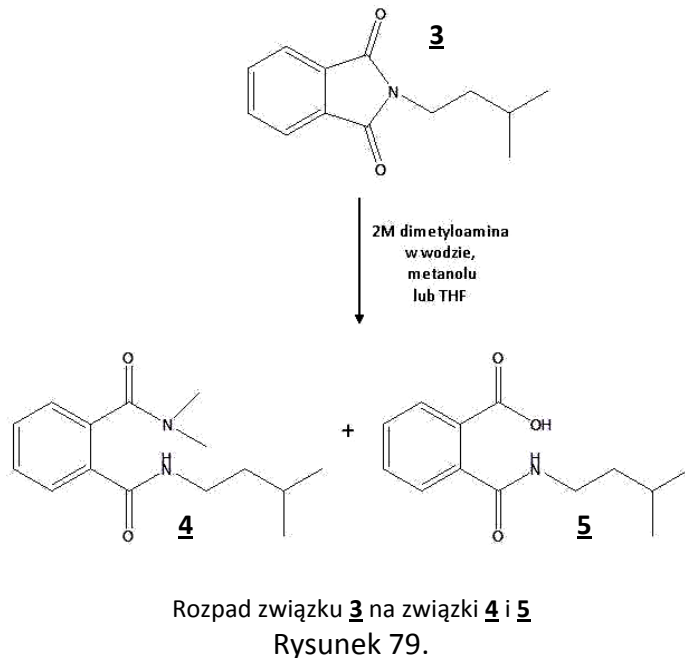
Następnie na produkt działano metanolem, 32% amoniakiem, 7 M roztworem amoniaku w etanolu, 8 M metyloaminą (MA) w wodzie lub etanolu, 2 M dimetyloaminą (DMA) w wodzie, metanolu lub THF. Powyższe reakcje prowadzono w czasie 15 i 30 minut oraz 2,5; 5; 22 i 72 godziny w temperaturze 55°C. Po upływie odpowiedniego czasu produkty reakcji rozdzielono na kolumnie chromatograficznej i scharakteryzowano protonowym i węglowym rezonansem magnetycznym oraz spektrometrią masową ESI.

Okazało się, że przy zastosowaniu 32% amoniaku, 7 M roztworu amoniaku w etanolu, 8 M MA w wodzie lub etanolu otrzymano produkty rozpadu wiązania amidowego (Rysunek 78), którymi są w zależności od zastosowanego odczynnika kwas fталowy, mono- i diamid kwasu fталowego oraz 1-amino-3-metylobutan. W przypadku zastosowania samego metanolu nie zaobserwowano żadnych zmian.





W przypadku zastosowania 2 M roztworu DMA w wodzie, metanolu lub THF otrzymano dużo lepsze rezultaty (Rysunek 79). Otrzymano mieszaninę dwóch produktów, z których związek **5** był żądanym produktem.



W tabeli 15 przedstawiono procentową zawartość powstających produktów **4** i **5** po upływie odpowiednich czasów reakcji (zawartość została wyznaczona na podstawie wielkości i intensywności fluorescencji plam na płytkach TLC).

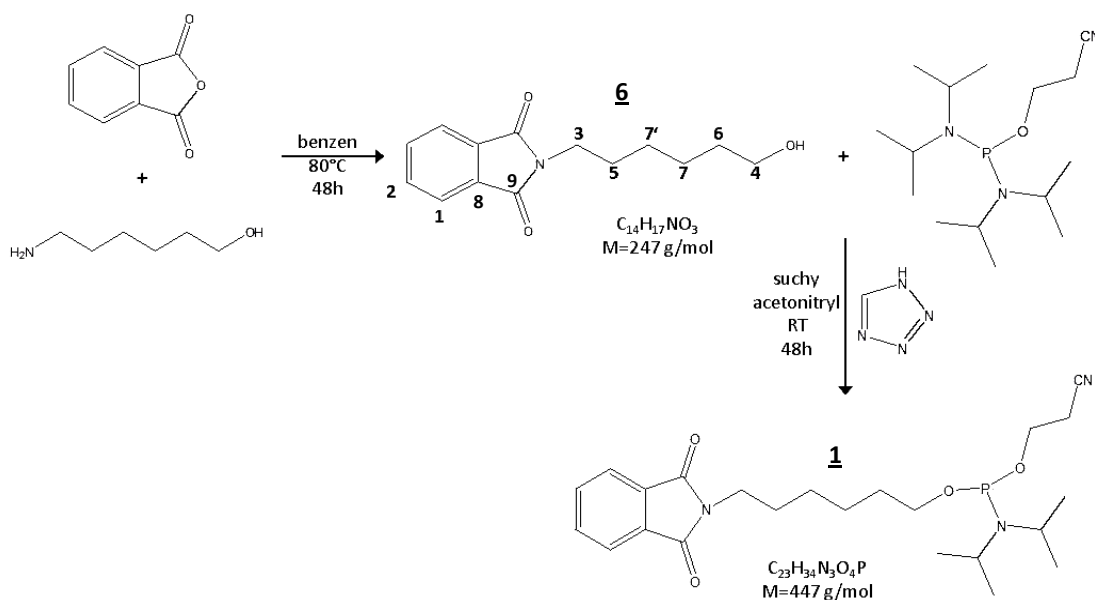
Tabela 15.

2M DMA w	Produkty	15'	30'	2,5h	5h	22h	72h
THF	<u>4</u>	30%	50%	70%	90%	100%	100%
Metanolu	<u>4</u> <u>5</u>	- 80%	- 90%	- 100%	- 100%	- 100%	2% 98%
wodzie	<u>4</u> <u>5</u>	95%	100%	95% 5%	95% 5%	70% 30%	10% 90%

Najlepszym odczynnikiem prowadzącym do odcięcia oligonukleotydu od podłoża stałego CPG przy jednoczesnym otwarciu pierścienia imidowego jest 2 M DMA w metanolu. Dodatkowym atutem jest fakt pojawienia się niepożądanego produktu 4 dopiero po czasie 72 godzin (zaznaczono czerwonym kwadratem w tabeli 2). Odcięcie oligonukleotydów od podłoża w temperaturze 55°C najczęściej prowadzi się przez maksymalnie 24 godziny.[154-157]

Po znalezieniu optymalnej metody odcięcia prekursora syntetycznej rybonukleazy 2'OMe RNA od podłoża stałego CPG i otwarcia pierścienia amidowego przystąpiono do syntezy fosforynu (1) i estru aktywnego (2).

Synteza fosforynu - 6-(*N,N*-ftalylamino)heksyl-*N,N*-diizopropylamino-2-cyanoetylofosforynu (1) (Rysunek 80).



Schemat syntezy związku 6 i 1  
Rysunek 80.

W wyniku reakcji bezwodnika ftalowego z 6-aminoheksanolem otrzymano *N*-(6-hydroksyheksylo)ftalimid (6), który oczyszczono chromatograficznie i scharakteryzowano

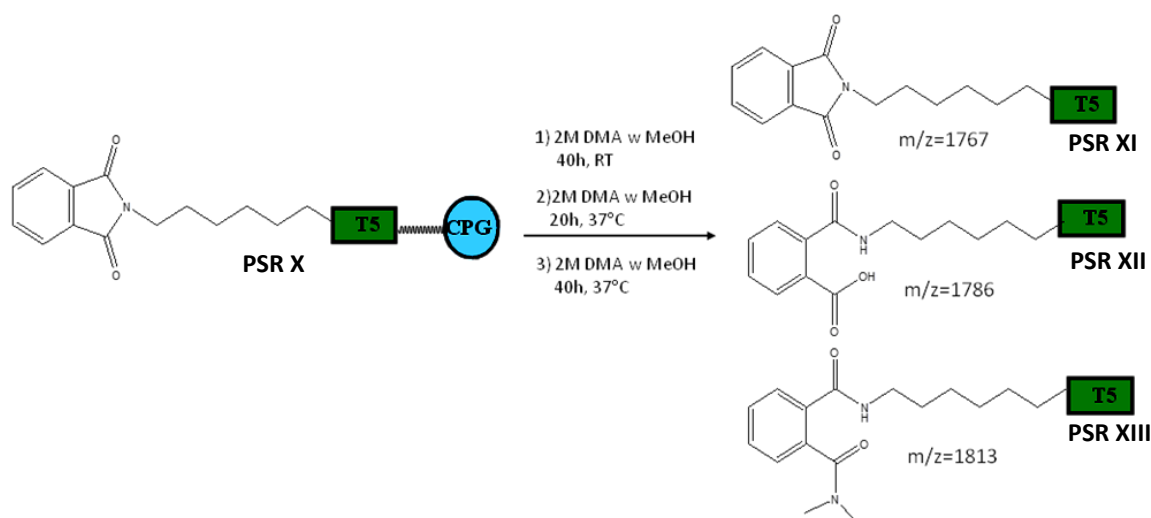
za pomocą metod spektroskopowych (protonowy (Tabela 16) i węglowy rezonans magnetyczny, spektrometrii masowej ESI).[158,159]

W widmach spektrometrii masowej ESI znaleziono pik przy wartości  $m/z$  270, który przypisano jonowi fragmentacyjnemu  $[C_{14}H_{17}NO_3+Na^+]^+$ .

Związek **6** wykorzystano do reakcji z bis(*N,N*-diizopropyl)-2-cyanoetyloamidofosforynem i otrzymano 6-(*N,N*-ftalylamino)heksyl-*N,N*-diizopropyl-2-cyanoetyloamidofosforyn (**1**), który scharakteryzowano fosforowym rezonansem magnetycznym. Otrzymano sygnał przy wartości 147,50 ppm, który odpowiada atomowi fosforu połączonemu ze związkiem **6**.

Związek **6** wykorzystano do syntezy prekursora syntetycznej rybonukleazy **PSR** na syntezaorze automatycznym z pentamerem tymidyny.

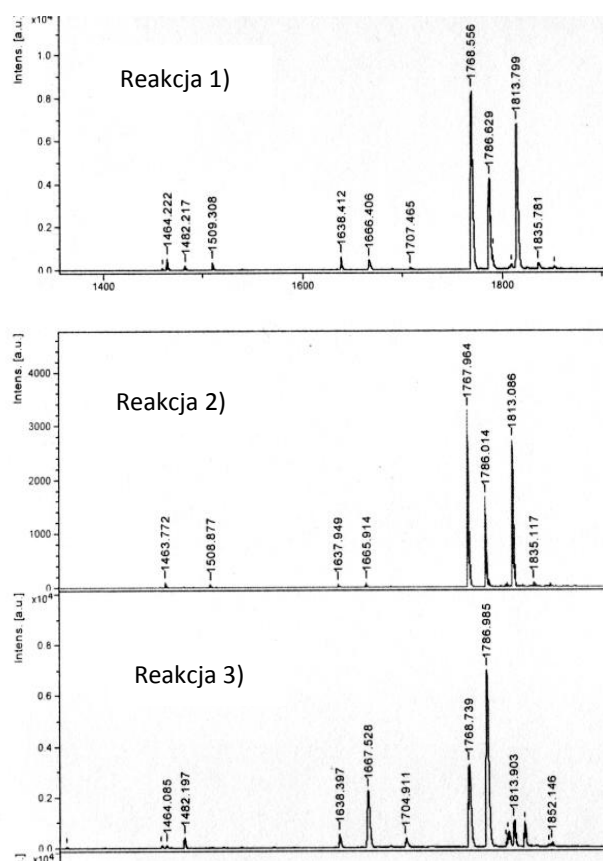
Przeprowadzono reakcje odcięcia od podłoża CPG przy jednoczesnym otwarciu pierścienia imidowego za pomocą 2 M roztworu DMA w metanolu. Reakcje prowadzono w temperaturze pokojowej i 37°C w czasach 20 i 40 godzin (Rysunek 81).



Odcięcie od podłoża CPG oraz otwarcie pierścienia imidowego związku **PSR X**

Rysunek 81.

W każdym przypadku otrzymano mieszaninę produktów **PSR XI**, **XII** i **XIII**. Najlepsze rezultaty uzyskano w przypadku prowadzenia reakcji w temperaturze 37°C przez 40 godzin (reakcja 3)) (Rysunek 82).

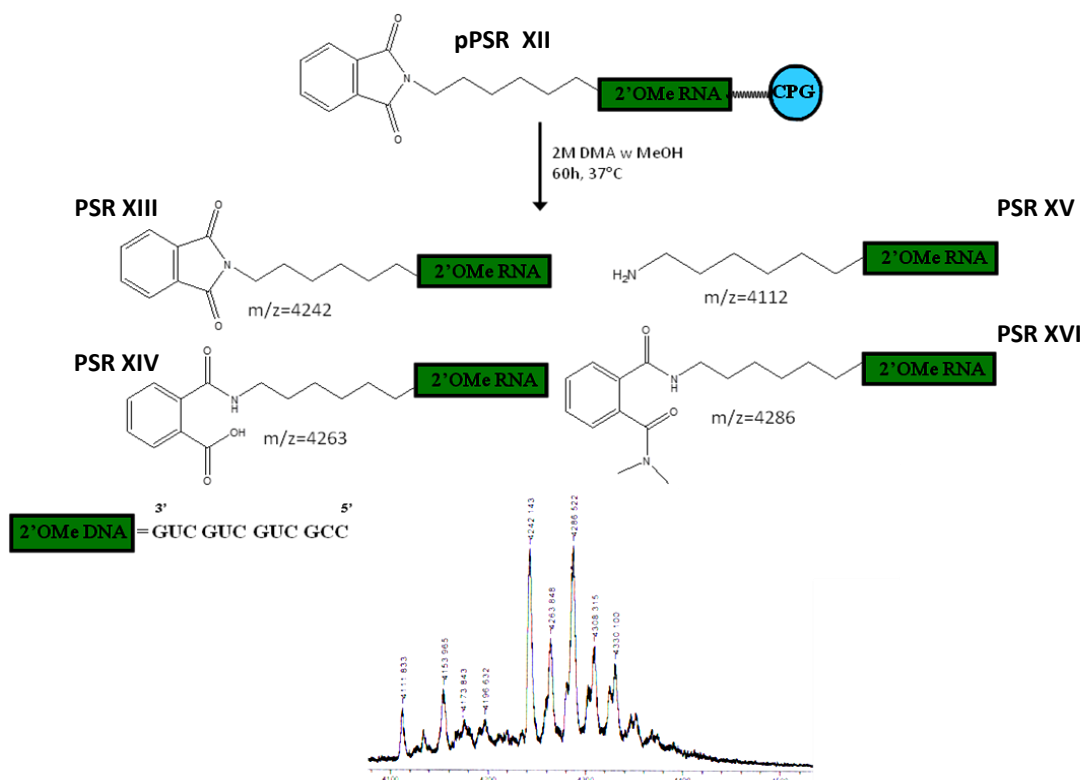


Widma masowe MALDI

Rysunek 82.

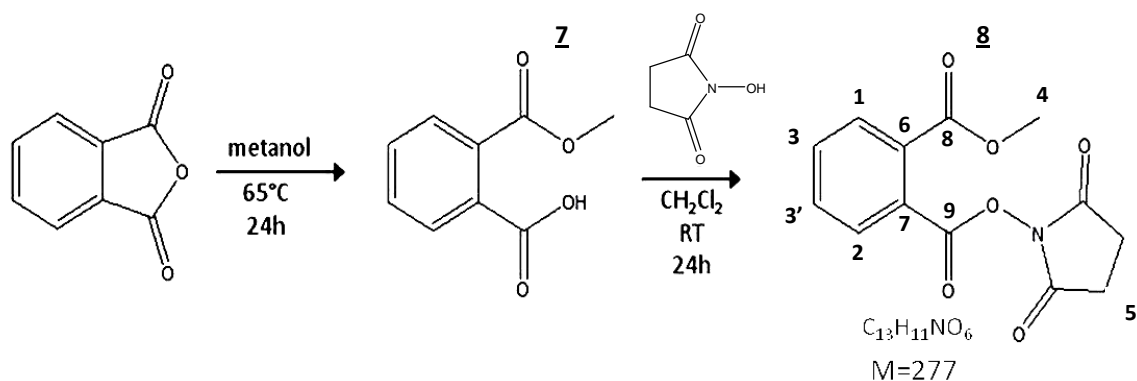
W przypadku zastosowania warunków opisanych dla reakcji 3) pik pochodzący od żądanego produktu **PSR XI** ma największą intensywność, w przypadku pozostałych reakcji w widmach spektrometrii masowej MALDI piki pochodzące od produktów ubocznych **PSR X** i **XII** wykazują większą intensywność od piku pochodzącego od żądanego produktu. Dlatego w następnych reakcjach postanowiono zastosować warunki z reakcji 3).

Warunki opisane dla reakcji 3) zastosowano na oligonukleotydzie docelowym o sekwencji: CCG CUG CUG CUG, odcięto go od podłoża stałego CPG stosując 2 M DMA w metanolu, reakcję prowadzono 40 godzin w temperaturze 37°C. Otrzymane rezultaty były dużo gorsze niż w przypadku zastosowania pentametu tymidyny (Rysunek 83). Otrzymano szereg produktów ubocznych **PSR XIII** i **XVI** oraz produkt całkowitego rozpadu wiązania amidowego **PSR XV**. Nie oznacza to jednak, że metoda ta nie nadaje się do otrzymywania prekursora syntetycznej rybonukleazy **PSR XIV**. Po przeprowadzeniu reakcji produkty rozdzielono elektroforetycznie.



Reakcja odcięcia od podłoża CPG oraz otwarcia pierścienia imidowego związku **pPSR XII**  
Rysunek 83.

W wyniku reakcji bezwodnika ftalowego z metanolem (Rysunek 84) otrzymano monometylowy ester kwasu ftalowego (**Z**), na który podziałano *N*-hydroksyimidem kwasu bursztynowego.



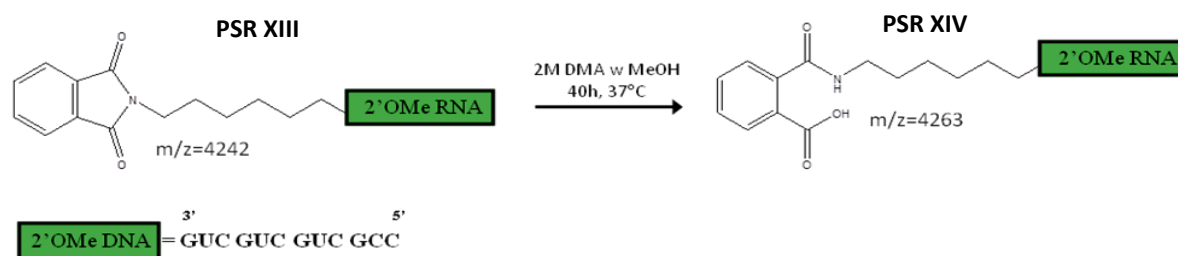
Schemat syntezy związku **8**  
Rysunek 84.

W wyniku syntezy otrzymano ester monometylo-monoimidobursztynylowy kwasu ftalowego (**8**), który scharakteryzowano spektroskopowo (spektroskopia protonowego

(Tabela 17) i węglowego rezonansu magnetycznego, spektrometria masowa ESI).[160-163]

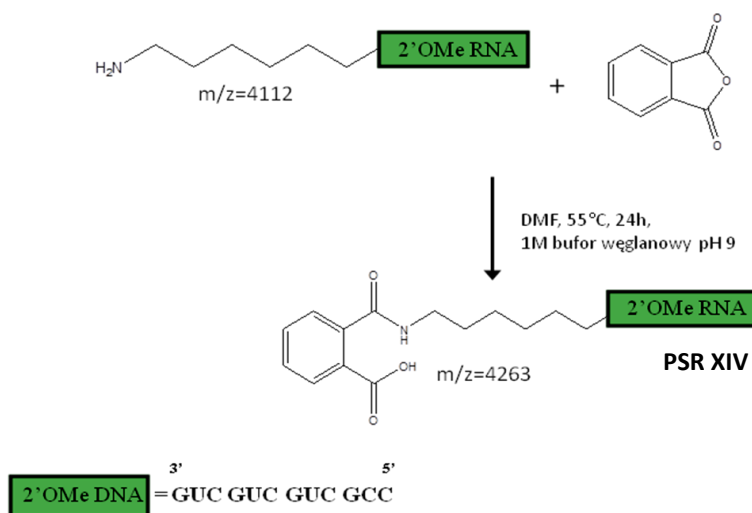
W widmach spektrometrii masowej ESI znaleziono pik przy wartości  $m/z$  300, który przypisano jonowi fragmentacyjnemu  $[C_{13}H_{11}NO_6+Na^+]^+$ .

Scharakteryzowany związek **8** wykorzystano do reakcji z odpowiednio sfunkcjonalizowanym oligonukleotydem 2'OMe RNA odciętym od podłoża CPG.[164] Do środowiska reakcji zawierającego sfunkcjonalizowany oligonukleotyd 2'OMe RNA wprowadzono ester monometylo-monoimidobursztynylowy kwasu ftalowego (**8**), reakcje prowadzono w DMF oraz 0,5 M buforze węglanowym pH=9, w temperaturze 37°C przez 18 godzin. Następnie oczyszczono na kolumnie SEPHADEX G50. W widmie spektrometrii masowej MALDI znaleziono pik przy wartości  $m/z$  4242, który odpowiada związkowi **PSR XIII**, co oznacza, że w przypadku zastosowania estru aktywnego otrzymano taki sam produkt jak w przypadku prowadzenia reakcji polegającej na przyłączeniu ligandu organicznego do 2'OMe RNA poprzez amidofosforyn. **PSR XIII** można przekształcić w **PSR XIV** działając na niego 2 M DMA w metanolu przez 40 godzin w temperaturze 37°C (Rysunek 85).



Reakcja otwarcia pierścienia imidowego w związku **PSR XIII**  
Rysunek 85.

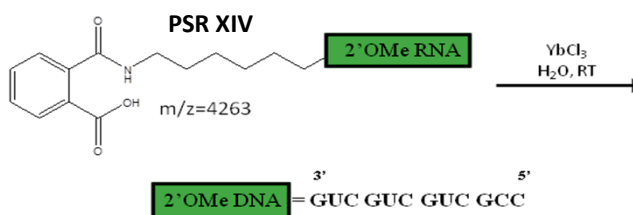
W związku z wieloetapową procedurą i długim czasem przygotowania prekursora syntetycznej rybonukleazy w powyższych metodach, postanowiono wypróbować jeszcze jedną metodę. Do środowiska zawierającego 2'OMe RNA posiadające na końcu 5' łącznik 6-aminoheksylowy wprowadzono 1 M bufor węglanowy pH=9 i bezwodnik kwasu ftalowego. Reakcję prowadzono w temperaturze 55°C przez 24 godziny w DMF (Rysunek 86).[165]

Schemat syntezy **PSR XIV**

Rysunek 86.

Po upływie 24 godzin odparowano rozpuszczalnik, a produkt oczyszczono z małowcząsteczkowych substancji na kolumnkach Sep-Pak i SEPHADEX G50. Następnie dokonano rozdzielu elektroforetycznego. Oczyszczony produkt zbadano spektrometrią masową MALDI, w która potwierdziła otrzymanie żadanego produktu **PSR XIV** (Rysunek 86) o masie 4263. Powyższa metoda pozwala na szybkie i wydajne przyłączanie ligandów organicznych do końca 5' 2'OMe RNA w oparciu o wiązanie amidowe. Wcześniejsze metody również prowadzą do otrzymania żadanego produktu **PSR XIV**, lecz wymaga to prowadzenia wieloetapowych reakcji, często o skomplikowanej procedurze, a wydajność tych reakcji nie jest wysoka.

Otrzymany związek **PSR XIV** skompleksowano z jonem  $\text{Yb}^{3+}$ , reakcje prowadzono w temperaturze pokojowej przez 24 godziny, a stosowanym rozpuszczalnikiem była woda (Rysunek 87). Po upływie 24 godzin otrzymany produkt analizowano za pomocą spektrometrii masowej MALDI. Zaobserwowano pik przy wartości  $m/z$  4657, który odpowiada związkowi **PSR XIV** skompleksowanemu z dwoma jonami  $\text{Yb}^{3+}$  i zawierającemu jako przeciwjony 3 grupy hydroksylowe.

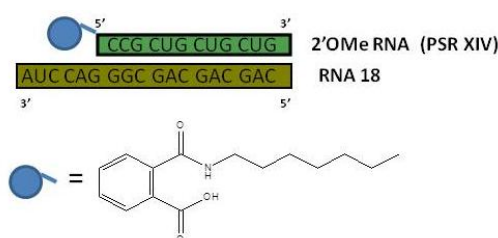
Reakcja kompleksowania jonu  $\text{Yb}^{3+}$  z **PSR XIV**

Rysunek 87.

## 4. Reakcje hydrolizy RNA 18 i RNA 21

### 4.1 Reakcje hydrolizy prowadzone za pomocą syntetycznej rybonukleazy

Zsyntezowany prekursor syntetycznej rybonukleazy **PSR XIV** wykorzystano do przeprowadzenia hydrolizy RNA 18 w sposób selektywny. W tym celu oznaczono  $^{32}\text{P}$  w pozycji 5' i oczyszczono elektroforetycznie kwas rybonukleinowy RNA 18 o sekwencji CAG CAG CAG CGG GAC CUA, który jest komplementarny z pewnym fragmentem związku **PSR XIV** (Rysunek 88).



Hybryda RNA 18/**PSR XIV**

Rysunek 88.

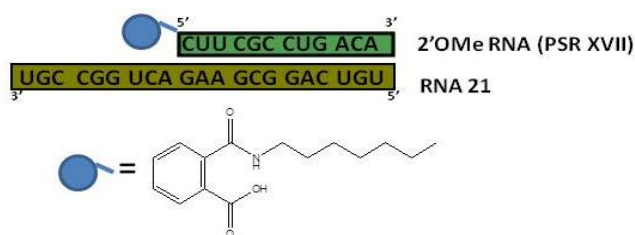
Po wykonaniu reakcji hydrolizy okazało się, że RNA 18 jest nietrwały i rozpada się przed przeprowadzeniem reakcji hydrolizy i nie tworzy trwałej hybrydy RNA 18/**PSR XIV**.

Dlatego postanowiono zmienić sekwencję RNA i zsyntezować syntetyczną rybonukleazę komplementarną do nowego RNA 21.

Sekwencja RNA 21:

5' UGU CAG GCG AAG ACU GGC CGU 3'

Wykorzystując reakcję, w której otrzymano związek **PSR XIV** otrzymano prekursor syntetycznej rybonukleazy **PSR XVII** (Rysunek 89).

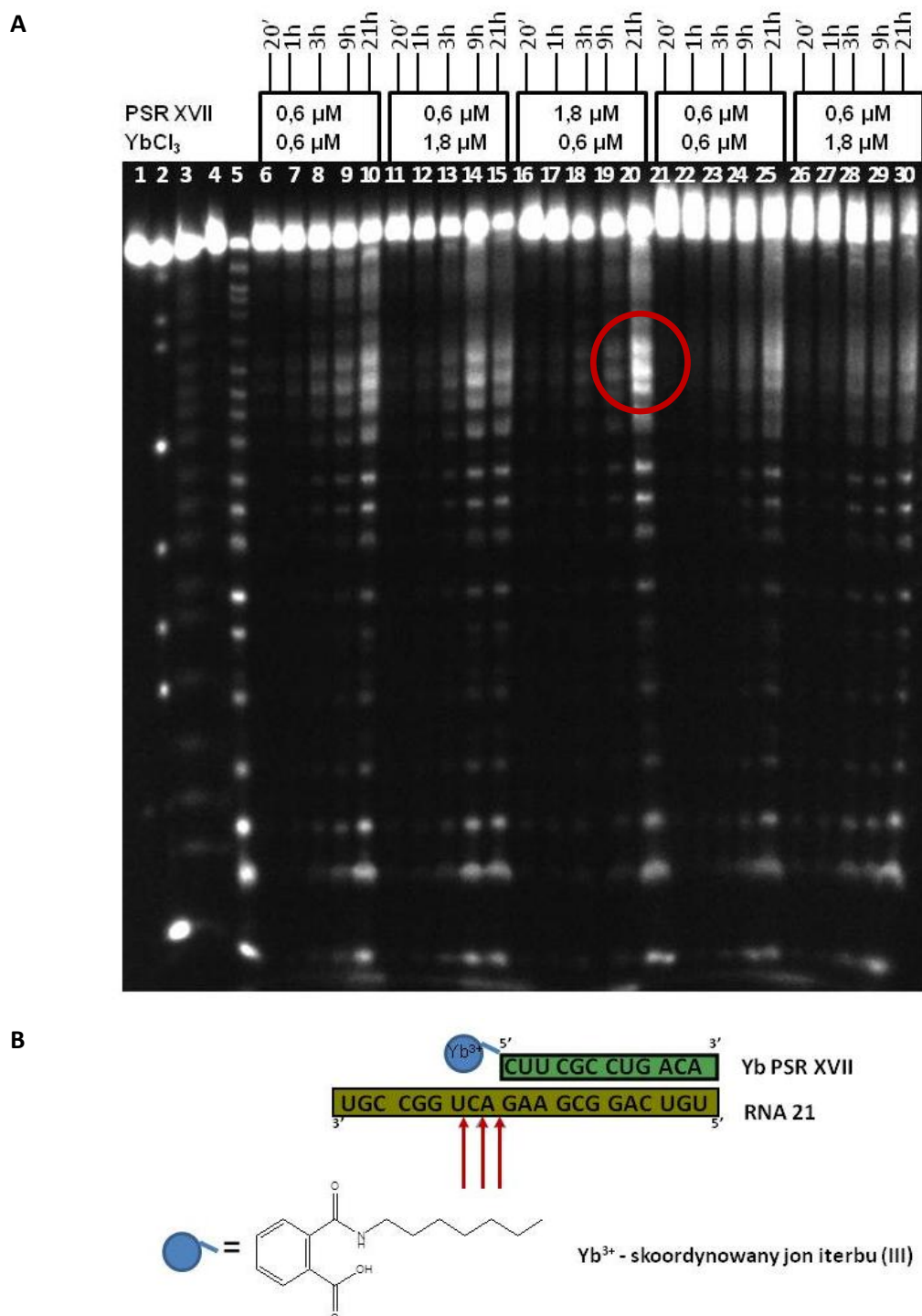


Hybryda RNA 21/**PSR XVII**

Rysunek 89.



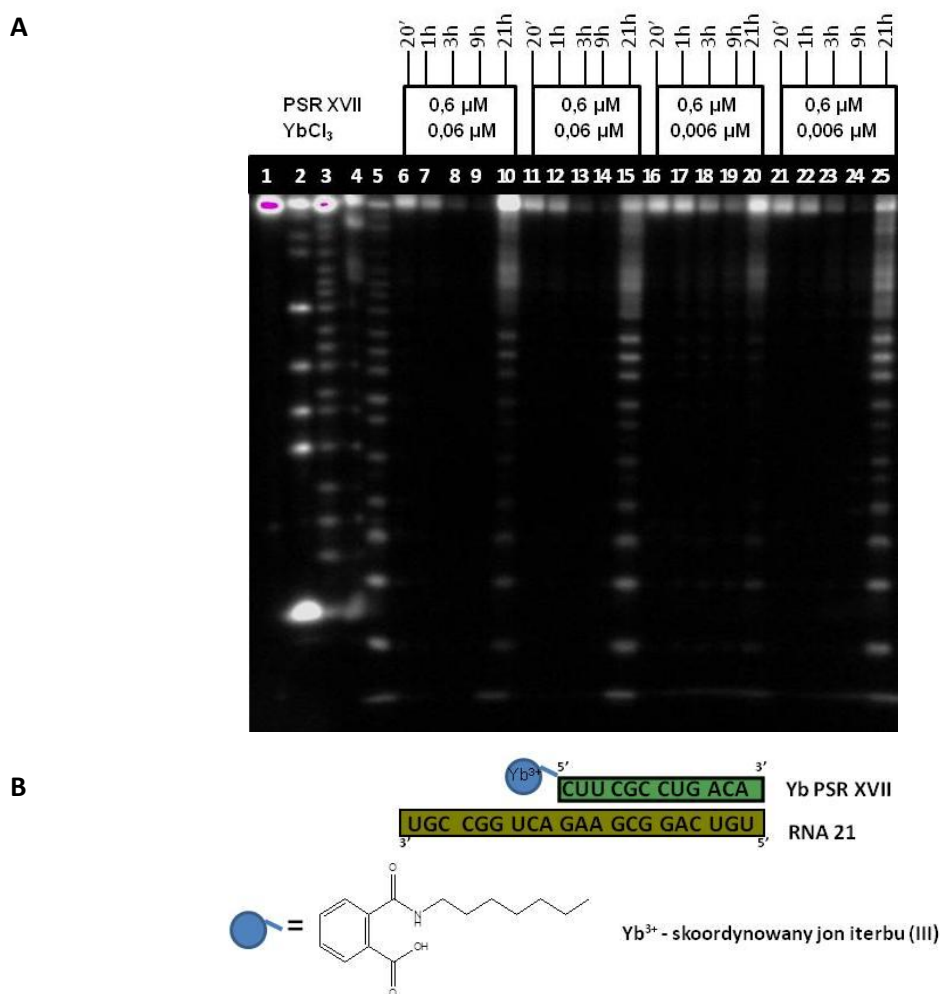
Przeprowadzono reakcje hydrolizy RNA 21. Poniżej przedstawiono autoradiogram (Rysunek 90A), z którego wynika, że wszystkie przeprowadzono reakcje hydrolizy wiązań O-P-O w RNA 21 zachodzą w sposób nieselektywny. W niektórych przeprowadzonych reakcjach zaobserwować można jednak pewną preferencję do miejsca, w którym zachodzi reakcja hydrolizy wiązań fosfodiesterowych. Najlepsze rezultaty otrzymano w przypadku prowadzenia trawienia za pomocą Yb PSR XVII (Rysunek 90B) w temperaturze 37°C (linie 6-20). Najlepszy rezultat wśród reakcji prowadzonych w 37°C otrzymano w przypadku, w którym stosunek PSR XVII:Yb<sup>3+</sup> wynosił 3:1 (na rysunku 90A zaznaczono czerwonym kołem, linia 20). W przypadku prowadzenia hydrolizy w temperaturze pokojowej hydroliza jest nieselektywna, nie widać jakichkolwiek preferencji do miejsca hydrolizy wiązania fosfodiesterowego w RNA 21 (linie 21-30). Im dłuższy czas prowadzenia reakcji hydrolizy, tym większy stopień hydrolizy.



Rysunek 90. Autoradiogram na żelu 12% PAA zawierającym 7 M mocznik (warunki denaturujące) przedstawiający hydrolizę RNA 21 oznaczonego na końcu 5' <sup>32</sup>P, za pomocą Yb PSR XVII. W każdej reakcji stężenie końcowe RNA 21 wynosiło 50 nM, w tym zawierało 10000 cpm γ-RNA 21. Reakcje prowadzono w buforze 10 mM Tris-HCl pH=7,5 zawierającym 50 mM roztwór NaCl, w temperaturze 37°C (linie 3-20) i pokojowej (linie 21-30). Reakcje zatrzymywano dodając 10 μl roztworu „stop solution” zawierającego 9 M mocznik, 25 mM EDTA i barwnik błękit bromofenylowy (BB). Całkowita objętość reakcji wynosiła 20 μl. Linia 1 – wolna próba; Linia 2 –hydroliza zachodząca pod wpływem kinazy T<sub>1</sub>; linia 3 – hydroliza zachodząca w środowisku alkalicznym; linia 4 – wolna próba zawierająca hybrydę PSR XVII-RNA 21; linia 5 – reakcja hydrolizy RNA 21 zachodząca pod wpływem chlorku iterbu(III). Yb PSR XVII- oznacza prekursor syntetycznej rybonukleazy skompleksowany z jonem iterbu(III).

W przypadku linii 20 preferowanym miejscem hydrolizy są wiązania fosfodiesterowe pomiędzy 7-8, 8-9 i 9-10 nukleotydem licząc od końca 3' RNA 21 (Rysunek 90B - miejsce preferowanej hydrolizy zaznaczono czerwonymi strzałkami), w którym nie utworzyła się hybryda RNA 21/Yb PSR XVII.

W związku z tym, że reakcja hydrolizy prowadzona w 37°C przez 21 godzin w stosunku PSR XVII:Yb<sup>3+</sup> 3:1 dała najlepsze rezultaty (Rysunek 90, zaznaczono czerwonym kołem, linia 20), postanowiono zmienić stosunek reagentów PSR XVII:Yb<sup>3+</sup> na 1:0,1 i 1:0,01. Reakcje prowadzono w temperaturze pokojowej i 37°C w tych samych czasach jak w przypadku wcześniejszym (Rysunek 91).



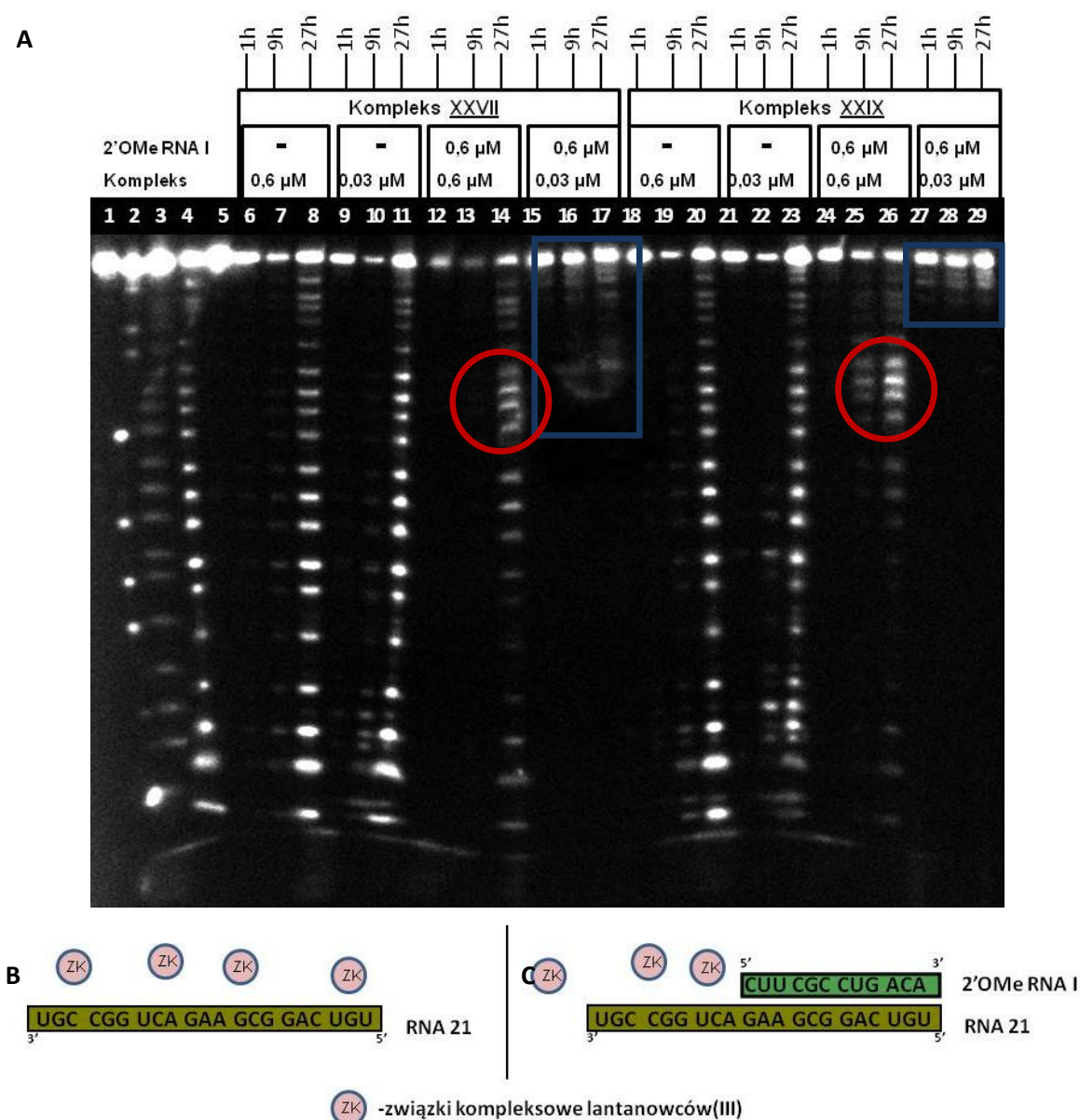
Rysunek 91. Autoradiogram na żelu 12% PAA zawierającym 7 M mocznik (warunki denaturujące) przedstawiający hydrolizę RNA 21 oznaczonego na końcu 5' <sup>32</sup>P, za pomocą Yb PSR XVII. W każdej reakcji stężenie końcowe RNA 21 wynosiło 50 mM, w tym zawierało 10000 cpm γ-RNA 21. Reakcje prowadzono w buforze 10 mM Tris-HCl pH=7,5 zawierającym 50 nM roztwór NaCl, w temperaturze 37°C (linie 3-5, 11-15, 21-25) i pokojowej (linie 1,6-10, 16-20). Reakcje zatrzymywano dodając 10 μl roztworu „stop solution” zawierającego 9 M mocznik, 25mM EDTA i barwnik błękit bromofenylowy (BB). Całkowita objętość reakcji wynosiła 20 μl. Linia 1 -5 prowadzono tak samo jak na rysunku 90. Yb PSR XVII- oznacza prekursor syntetycznej rybonukleazy skompleksowany z jonem iterbu(III).

Stwierdzono, że zmiana stosunków reagentów nie przyniosła oczekiwanych rezultatów. Okazało się, że reakcje hydrolizy wiązania O-P-O zachodzą w bardzo małym stopniu i obserwuje się ją głównie przy prowadzeniu reakcji przez 21 godzin (linie 10, 15, 20, 25). Żadna z prowadzonych reakcji nie wykazuje selektywności, nie widać też jakiegokolwiek preferencji względem któregoś miejsca w łańcuchu RNA 21.

## 4.2 Reakcje hydrolizy prowadzone za pomocą związków kompleksowych

W reakcjach hydrolizy zastosowano nowe kompleksy lantanowców(III) otrzymane w ramach niniejszej pracy oraz inne kompleksy lantanowców(III), których synteza i właściwości zostały opublikowane w ostatnich latach przez członków zespołu naukowego prof. Wandy Radeckiej-Paryzek.

Przeprowadzono hydrolizę RNA 21 pod wpływem nowych, hydrazonowych związków kompleksowych europu (XXVII), terbu (XXIX) (Rysunek 92A) i gadolinu (XXVIII) (Rysunek 93), otrzymanych w niniejszej pracy (rozdz. 2.1 str.91). Reakcje prowadzono w temperaturze 37°C i pH=7,5. Trawienie prowadzono dwoma metodami: pierwsza z nich polegała na wprowadzeniu do środowiska reakcji RNA 21 i związku kompleksowego (Rysunek 92B) - wówczas zachodząca hydroliza jest nieselektywna, druga natomiast polegała na wprowadzeniu dodatkowo komplementarnego łańcucha 2'OMe RNA I do RNA 21 (Rysunek 92C) – w tym przypadku hydroliza powinna zachodzić w sposób selektywny. Metoda druga miała prowadzić do zwiększenia trwałości łańcucha RNA 21 wskutek tworzenia się hybrydy 2'OMe RNA I/RNA 21.

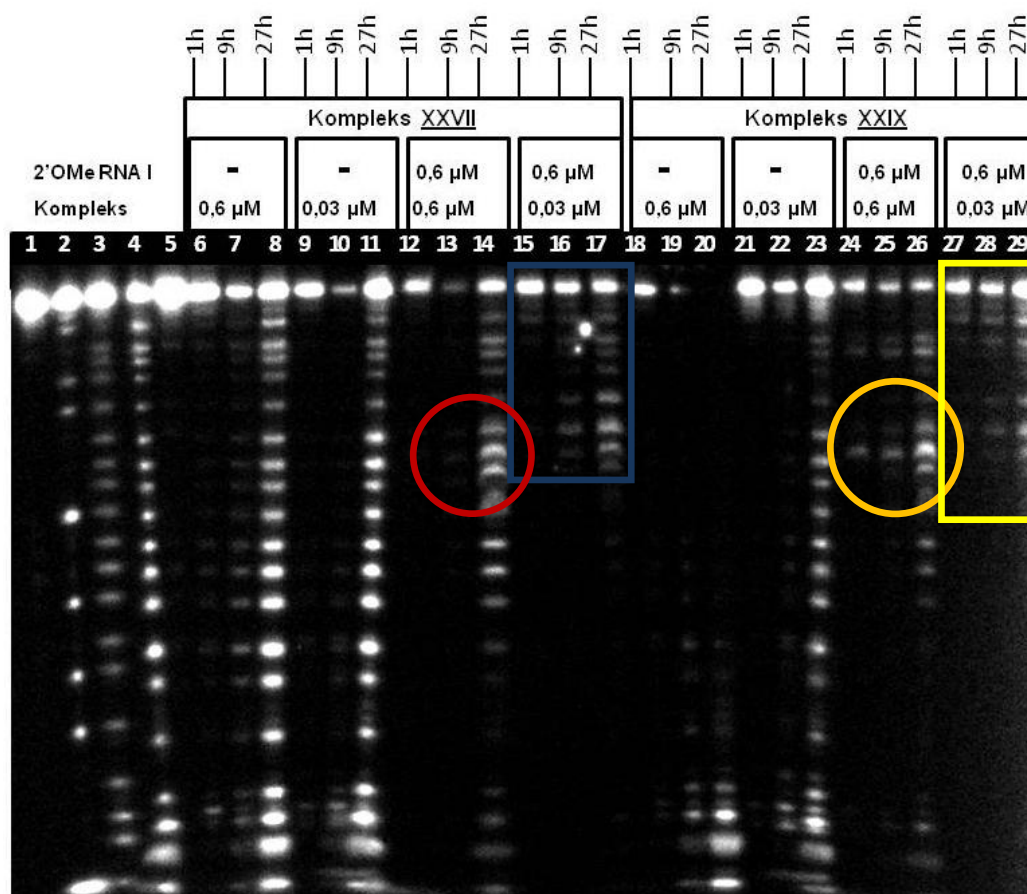


Rysunek 92. Autoradiogram na żelu 12% PAA zawierającym 7 M mocznik (warunki denaturujące) przedstawiający hydrolizę RNA 21 oznaczonego na końcu 5'  $^{32}\text{P}$  prowadzonej za pomocą związków kompleksowych lantanowców(III). W każdej reakcji stężenie końcowe RNA 21 wynosiło 50 mM, w tym zawarte było 10000 cpm  $\gamma$ -RNA 21. Reakcje prowadzono w buforze 10 mM Tris-HCl pH=7,5 zawierającym 50 nM roztwór NaCl, w temperaturze 37°C. Reakcje zatrzymywano dodając 10  $\mu\text{l}$  roztworu „stop solution” zawierającego 9 M mocznik, 25 mM EDTA i barwnik błękit bromofenylowy (BB). Całkowita objętość reakcji wynosiła 20  $\mu\text{l}$ . Linia 1-5 reakcje kontrolne prowadzono tak samo jak na rysunku 90. 2'OMe RNA I - oznacza 2'metylowany oligorybonukleotyd komplementarny do fragmentu RNA 21.

Na autoradiogramie (Rysunek 92A i 93) można obserwować, że reakcje hydrolizy RNA 21 zachodzą w każdym przypadku, z pewnymi różnicami. Reakcje 15-17 i 27-29, w których zastosowano 20-krotnie mniejsze stężenie związków kompleksowych europu(XXVII), terbu(XXIX) i gadolinu(XXVIII) w stosunku do 2'OMe RNA I, zachodzą selektywnie jednak w bardzo małym stopniu (Rysunek 92A i 93, niebieskie prostokąty). W przypadku

związku kompleksowego gadolinu (XXVIII) reakcja zachodzi w sposób selektywny przy czasie reakcji 1 godzina i 9 godzin, w przypadku prowadzenia reakcji 24 godziny reakcja przestaje być selektywna. Za mały stopień rozpadu wiązania fosfodiesterowego odpowiedzialne jest prawdopodobnie zbyt duże stężenie oligonukleotydu ochronnego 2'OMe RNA I uniemożliwiające wiązanie się związkom kompleksowym z łańcuchem RNA 21, wskutek tworzenia się agregatów 2'OMe RNA I lub związki kompleksowe ulegają rozpadowi, a jony lantanowców(III) są chelatowane przez 2'OMe RNA I. Przy zastosowaniu związkw kompleksowych europu (XXVII) i gadolinu (XXVIII), selektywna hydroliza wiązania fosfodiesterowego w RNA 21 zachodzi w miejscu, w którym nie tworzy się hybryda RNA 21/2'OMe RNA I (Rysunek 92A).[166] W sytuacji zastosowania związku kompleksowego (XIX) hydroliza wiązania O-P-O zachodzi tylko pomiędzy 1-2, 2-3 i 3-4 nukleotydem licząc od końca 3' RNA 21 (Rysunek 92A, miejsce zaznaczono niebieski prostokątem – linie 27-29).

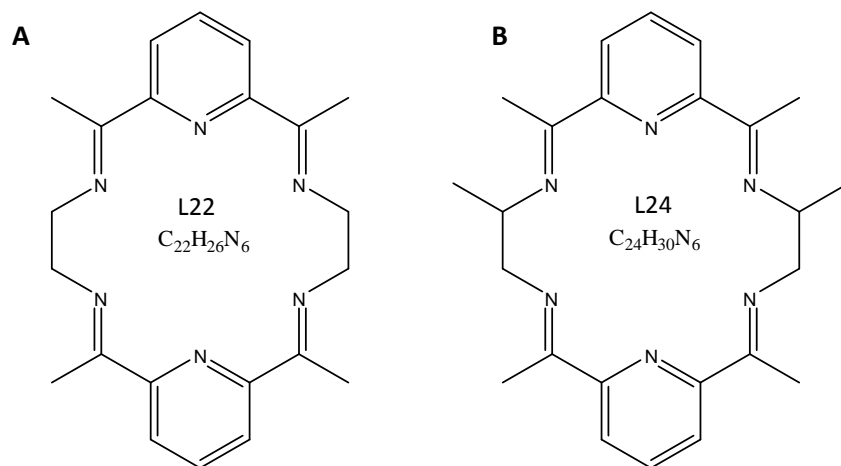
Jeśli stężenia 2'OMe RNA I i związkw kompleksowych (XXVII, XXVIII lub XXIX) były takie same, trawienie zachodziło nieselektywnie z pewną preferencją hydrolizy do wiązania fosfodiesterowego pomiędzy 7-8, 8-9 i 9-10 nukleotydem licząc od końca 3' RNA 21 (Rysunek 92A i 93 – miejsce preferowanej hydrolizy zaznaczono czerwonymi kołami). Spowodowane jest to faktem istnienia hybrydy 2'OMe RNA I/RNA 21 ochraniającej RNA 21. W sytuacji, w której zastosowano tylko sam związek kompleksowy, trawienie zachodziło w sposób nieselektywny i bez preferencji do jakiegokolwiek miejsca w łańcuchu RNA 21 (Linie 5-11 i 18-23 – Rysunek 92A i linie 5-11 – Rysunek 93).



Rysunek 93. Autoradiogram na żelu 12% PAA zawierającym 7 M mocznik (warunki denaturujące) przedstawiający hydrolizę RNA 21 oznaczonego na końcu 5'  $^{32}\text{P}$  prowadzonej za pomocą związków kompleksowych lantanowców(III). W każdej reakcji stężenie końcowe RNA 21 wynosiło 50 mM w tym zawarte było 10000 cpm  $\gamma$ -RNA 21. Reakcje prowadzono w buforze 10 mM Tris-HCl pH=7,5 zawierającym 50 nM roztwór NaCl, w temperaturze 37°C. Reakcje zatrzymywano dodając 10  $\mu\text{l}$  roztworu „stop solution” zawierającego 9 M mocznik, 25 mM EDTA i barwnik błękit bromofenyłowy (BB). Całkowita objętość reakcji wynosiła 20  $\mu\text{l}$ . Linia 1-5 reakcje kontrolne prowadzono tak samo jak na rysunku 90. 2'OMe RNA I - oznacza 2'metylowany oligorybonukleotyd komplementarny do fragmentu RNA 21.



Reakcje hydrolizy łańcucha RNA 21 prowadzono także za pomocą makrocyclicznych związków kompleksowych lantanowców(III) wywodzących się z 2,6-diacetylopirydyny i 1,2-diaminoetanu ( $\text{L22La}(\text{NO}_3)_3$  lub  $\text{L22Pr}(\text{NO}_3)_3(\text{H}_2\text{O})_2$ ) (Rysunek 94A) lub 1-metylo-1,2-diaminoetanu ( $\text{L24La}(\text{NO}_3)_3(\text{CH}_3\text{OH})_2$ ) (Rysunek 94B) [167-169] oraz salenowych i hydrazonowych kompleksów lantanowców(III) otrzymanych w niniejszej pracy: dysprozu(III) VII, holmu(III) VIII, prazeodymu(III) XVI, iterbu(III) XXII, prazeodymu(III) XLIII i iterbu(III) XLVII.

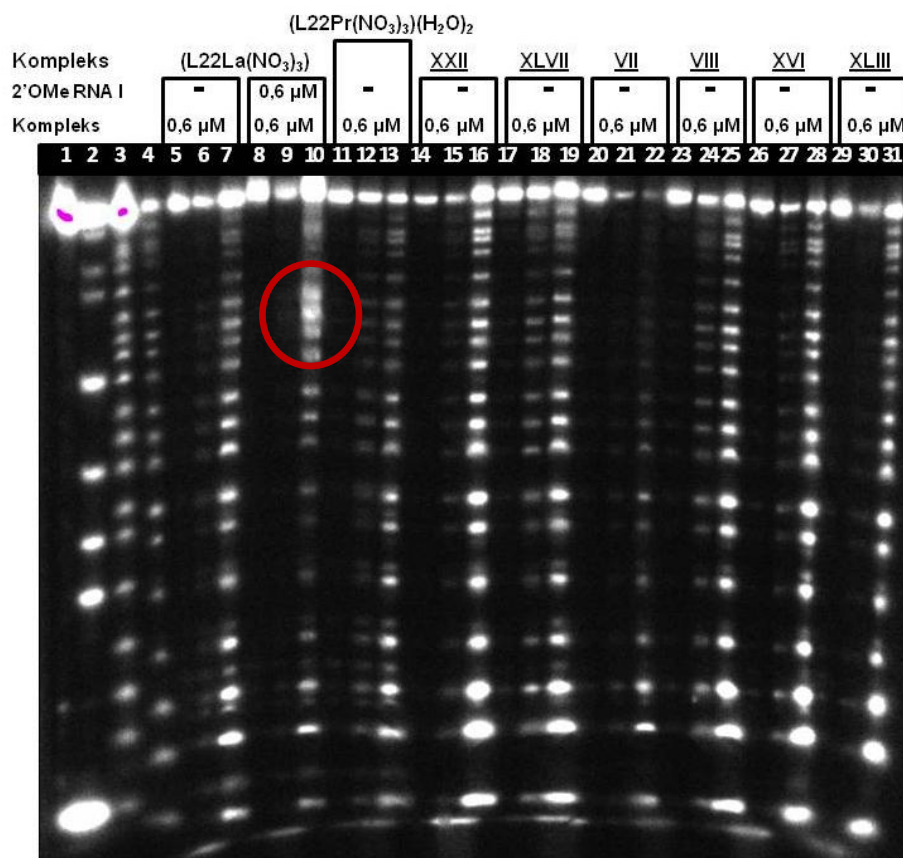


Wzór strukturalny ligandów L22 i L24  
Rysunek 94.

Zaobserwowano, że związek kompleksowy ( $\text{L24La}(\text{NO}_3)_3(\text{CH}_3\text{OH})_2$ ) hydrolizuje RNA 21 w sposób selektywny, w przypadku, w którym stężenie kompleksu jest 20-krotnie mniejsze od stężenia 2'OMe RNA I (Rysunek 93, zaznaczono żółtym prostokątem). Hydroliza jest selektywna przy krótkim czasie prowadzenia reakcji (około 9 godzin), jednak zachodzi ona w bardzo małym stopniu. W przypadku, w którym stężenia związku kompleksowego i 2'OMe RNA I są równe, wówczas hydroliza zachodzi nieselektywnie, ale można zauważyć pewną preferencję do zachodzenia hydrolizy pomiędzy nukleozydami 1-9 licząc od końca 3' RNA 21 (Rysunek 93, żółte koło).

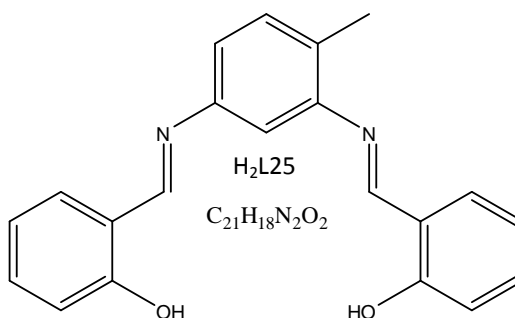
W przypadku zastosowania kompleksu  $\text{L22La}(\text{NO}_3)_3$  po raz kolejny wykazano, że tworząca się hybryda 2'OMe RNA I/RNA 21 w niewielkim stopniu powoduje preferowanie hydrolizy wiązań diestrowych pomiędzy 7-8, 8-9 i 9-10 nukleozydem w łańcuchu RNA 21 licząc od końca 3' (miejsce zaznaczono czerwonym kołem na Rysunku 95, linia 10), w porównaniu z reakcją (linia 7), w której nie było hybrydy. W pozostałych przypadkach (Rysunek 95) nie stosowano protekcyjnego 2'OMe RNA I, wskutek czego reakcje zachodziły w sposób nieselektywny. Linie 11-13 przedstawiają hydrolizę RNA 21

pod wpływem  $\text{L22Pr}(\text{NO}_3)_3(\text{H}_2\text{O})_2$ ; linie 14-16 XXII; linie 17-19 XLVII; linie 20-22 VII; linie 23-25 VIII; linie 26-28 XVI i linie 29-31 XLIII. Niezastosowanie 2'OMe RNA I skutkuje nieselektywną hydrolizą i rozpadem RNA 21 na poszczególne nukleozydy.



Rysunek 95. Autoradiogram na żelu 12% PAA zawierającym 7 M mocznik (warunki denaturujące) przedstawiający hydrolizę RNA 21 oznaczonego na końcu 5'  $^{32}\text{P}$  prowadzonej za pomocą związków kompleksowych lantanowców(III). W każdej reakcji stężenie końcowe RNA 21 wynosiło 50 mM w tym zawierała 10000 cpm  $\gamma$ -RNA 21. Reakcje prowadzono w buforze 10 mM Tris-HCl pH=7,5 zawierającym 50 nM roztwór NaCl, w temperaturze 37°C w czasach 1 godzina-linie 5, 8, 11, 14, 17, 20, 23, 26, 29; 9 godzin-linie 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30; 27 godzin-linie 7, 10, 13, 16, 19, 22, 25, 28, 31. Reakcje zatrzymywano dodając 10  $\mu\text{l}$  roztworu „stop solution” zawierającego 9 M mocznik, 25 mM EDTA i barwnik błękit bromofenylowy (BB). Całkowita objętość reakcji wynosiła 20  $\mu\text{l}$ . Linia 1 -4 prowadzono tak samo jak na rysunku 90. 2'OMe RNA I - oznacza 2'metylowany oligorybonukleotyd komplementarny do fragmentu RNA 21.

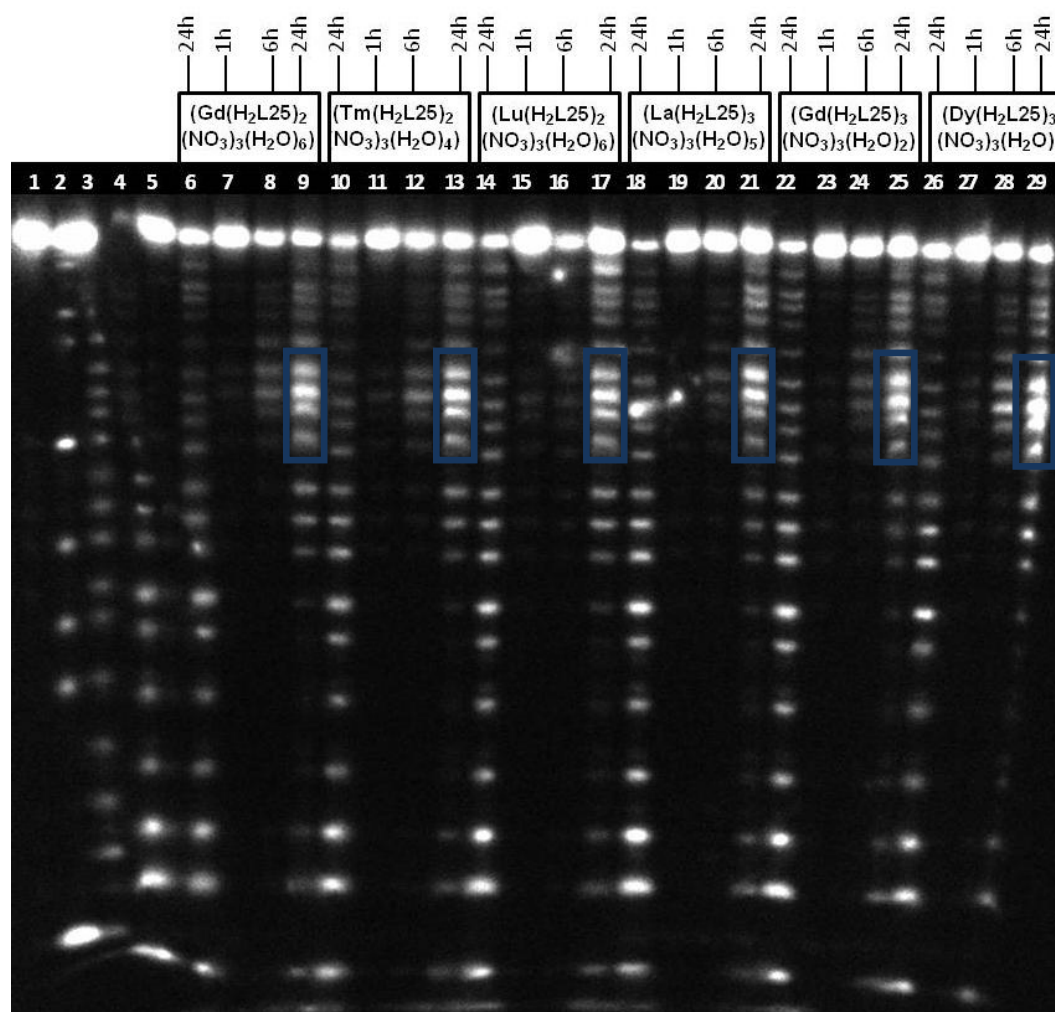
Związki kompleksowe gadolinu (III) ( $\text{Gd}(\text{H}_2\text{L25})_2(\text{NO}_3)_3(\text{H}_2\text{O})_6$ ), tulu(III) ( $\text{Tm}(\text{H}_2\text{L25})_2(\text{NO}_3)_3(\text{H}_2\text{O})_4$ ), lutetu(III) ( $\text{Lu}(\text{H}_2\text{L25})_2(\text{NO}_3)_3(\text{H}_2\text{O})_6$ ), lantanu(III) ( $\text{La}(\text{H}_2\text{L25})_3(\text{NO}_3)_3(\text{H}_2\text{O})_5$ ), gadolinu(III) ( $\text{Gd}(\text{H}_2\text{L25})_3(\text{NO}_3)_3(\text{H}_2\text{O})_2$ ) i dysprozu(III) ( $\text{Dy}(\text{H}_2\text{L25})_3(\text{NO}_3)_3(\text{H}_2\text{O})$ ) zawierające ligand  $\text{H}_2\text{L25}$  (Rysunek 96) [170,171] zastosowano w reakcji hydrolizy RNA 21.



Wzór strukturalny ligandu  $\text{H}_2\text{L25}$

Rysunek 96.

W przypadku, w którym do środowiska reakcji nie wprowadzono ochronnego 2'OMe RNA I reakcje hydrolizy zachodzące pod wpływem związków kompleksowych zawierających ligand  $\text{H}_2\text{L25}$  były nieselektywne (Rysunek 97, linie: 6, 10, 14, 18, 22 i 26). Przy zastosowaniu protekcyjnego 2'OMe RNA I w 20-krotnym nadmiarze względem związków kompleksu, reakcja hydrolizy zachodziła w sposób selektywny przy czasach prowadzenia reakcji 1 i 6 godzin (Rysunek 97, linie: 7-8, 11-12, 15-16, 19-20, 23-24 i 27-28). W sytuacji prowadzenia reakcji przez 24 godziny reakcja przestaje być selektywna, ale można zauważyć pewną preferencję do niektórych miejsc zachodzenia hydrolizy wiązania fosfodiesterowego w łańcuchu RNA 21 (Rysunek 97; linie: 9, 13, 17, 21, 25 i 29; miejsca zaznaczono niebieskimi prostokątami).



Rysunek 97. Autoradiogram na żelu 12% PAA zawierającym 7 M mocznik (warunki denaturujące) przedstawiający hydrolizę RNA 21 oznaczonego na końcu 5'  $^{32}\text{P}$  prowadzonej za pomocą związków kompleksowych lantanowców(III). W każdej reakcji stężenie końcowe RNA 21 wynosiło 50 mM, w tym zawierało 10000 cpm  $\gamma$ -RNA 21. Reakcje prowadzono w buforze 10 mM Tris-HCl pH=7,5 zawierającym 50 nM roztwór NaCl, w temperaturze 37°C. Reakcje zatrzymywano dodając 10  $\mu\text{l}$  roztworu „stop solution” zawierającego 9 M mocznik, 25 mM EDTA i barwnik błękit bromofenyłowy (BB). Całkowita objętość reakcji wynosiła 20  $\mu\text{l}$ . Linia 1-5 prowadzono tak samo jak na rysunku 90; Linie 6, 10, 14, 18, 22 i 26 zawierały 600 nM odpowiedniego związku kompleksowego. Linie 7-9, 11-13, 15-17, 19-21, 23-25 i 27-29 zawierały 30 nM odpowiedniego związku kompleksowego oraz 600 nM 2'OMe RNA I. 2'OMe RNA I - oznacza 2'metylowany oligorybonukleotyd komplementarny do fragmentu RNA 21.

Stwierdzono, że najlepsze wyniki uzyskano w przypadku prowadzenia hydrolizy RNA 21 w obecności ochronnego 2'OMe RNA I (tworzy się wówczas hybryda RNA 21/2'OMe RNA I) przy jednoczesnym zastosowaniu 20-krotnego niedomiaru jonu lub kompleksu lantanowca(III) względem ochronnego 2'OMe RNA I. Wykazano, że selektywna hydroliza wiązania fosfodiesterowego zachodzi najczęściej pomiędzy 7-8, 8-9 i 9-10 nukleozydem w łańcuchu RNA 21 licząc od końca 3'. W przypadku, gdy hydroliza zachodziła w sposób nieselektywny niejednokrotnie można było zaobserwować pewną

preferencję do miejsca rozpadu łańcucha RNA 21. Wykazano, że gdy nie stosowano żadnego łańcucha ochronnego, hydroliza zawsze zachodziła w sposób nieselektywny.

Porównano hydrolizę RNA zachodzącą pod wpływem jonu lantanowca z hydrolizą zachodzącą pod wpływem związków kompleksowych i stwierdzono, że zastosowanie związków kompleksowych lantanowców niejednokrotnie prowadzi do hydrolizy selektywnej. W przypadku zastosowania jonu lantanowca trawienie RNA zachodzi nieselektywnie, jednak z pewną preferencją do miejsca rozpadu łańcucha RNA 21. Można przypuszczać, że ligand przyłączony do końca 5' prekursora syntetycznej rybonukleazy PSR XVII posiada za małą ilość atomów donorowych, przez co jon lantanowca koordynuje tylko w małym stopniu, a to prowadzi do hydrolizy nieselektywnej z pewną preferencją do miejsca rozpadu łańcucha RNA 21. Z drugiej strony jony lantanowców występujące w związkach kompleksowych skoordynowane są z dużymi ligandami organicznymi, a to ogranicza ich dostęp do RNA 21, przez co hydroliza często zachodzi w sposób selektywny.

## VI. PODSUMOWANIE WYNIKÓW

W niniejszej pracy otrzymano i scharakteryzowano nowe związki kompleksowe lantanowców(III) z salenowymi i hydrazonowymi ligandami typu zasad Schiffa.

Metodą templatową otrzymano związki kompleksowe lantanowców zawierające salenowe ligandy będące produktami reakcji kondensacji [2+1], dwóch cząsteczek aldehydu salicylowego i jednej cząsteczki 1,12-diamino-4,9-dioksa-dodekanu:  $H_2L^1$  - *N,N'*-bis(salicylideno)-1,12-diamino-4,9-dioksadodekan lub jednej cząsteczki 2-metylo-1,5-diamino-pentanu:  $H_2L^2$  - *N,N'*-bis(salicylideno)-1,5-diamino-2-metylo-pentan zachodzącej w obecności jonów metali. Ligand  $H_2L^1$  jest  $N_2O_4$ -donorowym ligandem, natomiast ligand  $H_2L^2$   $N_2O_2$ -donorowym ligandem. Na podstawie danych z metod analitycznych i spektroskopowych stwierdzono, że stosunek ligand:metal w większości przypadków wynosi 1:1 lub 2:2 (wyjątek stanowią kompleksy **XI-XIV**). Wyniki analizy termogravimetrycznej pozwoliły ustalić wewnętrzną i zewnętrzną sferę koordynacyjną poszczególnych kompleksów. Na podstawie spektroskopii w podczerwieni stwierdzono, że jony azotanowe(V) koordynujące z jonem centralnym są zawsze dwukleszczowe. W przypadku wielu związków kompleksowych zawierających ligand  $H_2L^1$  lub  $H_2L^2$  ustalono liczbę koordynacyjną jonu centralnego.

Otrzymano i scharakteryzowano ligandy 2,6-diacetylopirydyno-bis(2-aminobenzoilohydrazon) – ligand  $L^3$  i 2,6-diacetylopirydyno-(2-aminobenzoilohydrazon) – ligand  $L^4$ , które wykorzystano do syntezy związków kompleksowych lantanowców(III) metodą bezpośrednią.

Stwierdzono, że synteza związków kompleksowych lantanowców(III) zawierających 2,6-diacetylopirydyno-bis(2-aminobenzoilohydrazon) – ligand  $L^3$  metodą templatową (kondensacji *in situ*) jest dużo lepsza i wydajniejsza od metody bezpośredniej, gdyż w wyniku tej metody związki kompleksowe otrzymano w postaci kryształów. To pozwoliło na określenie struktury krystalicznej, która jest jedyną metodą

ustalającą jednoznacznie skład wewnętrznej i zewnętrznej sfery koordynacyjnej, liczbę koordynacyjną oraz ułożenie cząsteczek w przestrzeni. W metodzie tej otrzymane związki nie wymagały dodatkowych procedur dotyczących oczyszczania. We wszystkich otrzymanych związkach kompleksowych zawierających ligand  $L^3$  stosunek ligandu do metalu wynosił 1:1 (wyjątek stanowi związek kompleksowy neodymu(III) **XXXVI**, w którym stosunek ligand do metalu wynosi 2:1).

Ustalono struktury krystaliczne azotanowych(V) i chlorkowych kompleksów lantanowców erbu(III), terbu(III), gadolinu(III), europu(III), dysprozu(III) i neodymu(III) z 2,6-diacetylopirydyno-bis(2-aminobenzoilohydrazonem) – ligandem  $L^3$ . Kompleksy terbu(III), gadolinu(III), europu(III), dysprozu(III) są izomorficzne i krystalizują w układzie jednoskośnym, grupie przestrzennej  $P2_1/n$ . Związek kompleksowy erbu(III) krystalizuje w układzie trójskośnym, grupie przestrzennej  $P-1$ . Związek kompleksowy neodymu(III) krystalizuje w układzie rombowym, grupie przestrzennej  $P_{can}$ .

Otrzymano i scharakteryzowano związki kompleksowe lantanowców(III) z 2,6-diacetylopirydyno-(2-aminobenzoilohydrazonem) – ligandem  $L^4$ . Stosunek ligandu do metalu w tych kompleksach wynosił 1:1 lub 3:2. Związki kompleksowe z ligandem  $L^4$  otrzymano metodą bezpośrednią. Dowiedziono, że jest to jedyna metoda umożliwiająca otrzymanie tych związków. Próby otrzymania tych kompleksów metodą templatową (kondensacji *in situ*) zawsze prowadziły do otrzymania związków kompleksowych zawierających ligand  $L^3$ .

Opracowano trzy skuteczne metody przyłączania do końca 5' 2'OMe RNA ligandów organicznych. Dwie z nich polegały na prowadzeniu reakcji na podłożu stałym CPG, co miało pozwolić na łatwiejsze oczyszczanie poreakcyjne. Trzecia metoda polegała na prowadzeniu reakcji w roztworze, wymagała jednak dodatkowego oczyszczania poreakcyjnego. Metoda, w której prekursor syntetycznej rybonukleazy **PSR** otrzymywano w roztworze, okazała się najszybszą, najwydajniejszą. Pierwsze dwie metody wymagały prowadzenia wielu reakcji, w których często wydajności były niskie. Otrzymano prekursor syntetycznej rybonukleazy, który następnie wykorzystano do prowadzenia reakcji hydrolizy RNA.

Podczas prowadzonych badań okazało się, że reakcje odcięcia od podłoża stałego CPG prekursora syntetycznej rybonukleazy **PSR**, często prowadziły do rozpadu wiązania amidowego. Fakt ten wymusił opracowanie najlepszej metody odcięcia od podłoża stałego CPG prekursora syntetycznej rybonukleazy bez jej rozpadu. Metodę opracowano.

Przeprowadzono reakcje hydrolizy za pomocą syntetycznej rybonukleazy. Podano najlepsze warunki prowadzenia hydrolizy RNA. Przeprowadzono reakcje hydrolizy, w których stosowano różne stosunki stechiometryczne PSR:Ln:RNA. Zmieniano także czas, temperaturę, w których prowadzono hydrolizę. Najlepsze rezultaty uzyskano w przypadku stosowania 20-krotnego nadmiaru PSR względem jonu lantanowca. Zachodzący wówczas rozpad wiązania diestrowego zachodził co prawda w sposób nieselektywny, ale z preferencją do pewnych fragmentów RNA.

Przeprowadzono reakcje hydrolizy za pomocą związków kompleksowych. W każdym przypadku, w którym nie zastosowano ochronnego 2'OMe RNA, hydroliza zachodziła w sposób nieselektywny. Wcześniejsze utworzenie hybrydy RNA/2'OMe RNA powodowało, że hydroliza w wielu przypadkach przebiegała w sposób selektywny. Sелеktywność trawienia RNA w dużej mierze zależała od stosunku stechiometrycznego wprowadzanych związków kompleksowych i ochronnego 2'OMe RNA. W przypadkach, których hydroliza RNA zachodziła w sposób nieselektywny, często można było zaobserwować miejsca, których rozpad wiązań diestrowych zachodził w większym stopniu.





## VII. BIBLIOGRAFIA

---

- [1] H. Schiff, *Ann. Suppl.* 3 **(1864)** 343.
- [2] A. Cooper, S.F. Dixon, M.A. Nutley, J.L. Robb, *J. Am. Chem. Soc.* 109 **(1987)** 7254.
- [3] W. Radecka-Paryzek, V. Patroniak-Krzyminiewska, *Wiad. Chem.* 50 **(1996)** 171.
- [4] C.F.G.C. Geraldes, C. Luchinat, *Met. Ions Biol. Syst.* 40 **(2003)** 513.
- [5] M. Komiyama, *Met. Ions Biol. Syst.* 40 **(2003)** 463.
- [6] F. Benetollo, P. Di Bernardo, S. Tamburini, P.A. Vigato, P. Zanonato, *Inorg. Chem. Commun.* 11 **(2008)** 246.
- [7] S. Tamburini, V. Peruzzo, F. Benetollo, P.A. Vigato, *Eur. J. Inorg. Chem.* **(2010)** 1853.
- [8] C.M.G. dos Santos, A.J. Harte, S.J. Quinn, T. Gunnlaugsson, *Coord. Chem. Rev.* 252 **(2008)** 2512.
- [9] S.V. Eliseeva, J-C.G. Bünzli, *Chem. Soc. Rev.* 39 **(2010)** 189.
- [10] S. Faulkner, S.J.A. Pope, *J. Am. Chem. Soc.* 125 **(2003)** 10526.
- [11] P.A. Vigato, S. Tamburini, *Coord. Chem. Rev.* 248 **(2004)** 1717.
- [12] S.A. Cotton; *Lanthanides and Actinides*, Macmillan, London **(1991)** 191.
- [13] M. Paluch, J. Lisowski, T. Lis, *Dalton Trans.* **(2006)** 381.
- [14] W. Radecka-Paryzek, *Wiad. Chem.* **(2008)** 177.
- [15] D.P. Riley, *Chem. Rev.* 99 **(1999)** 2573.
- [16] T. Katsuki, *Chem. Soc. Rev.* 33 **(2004)** 437.
- [17] C. Janik, *Dalton Trans.* **(2003)** 2781.
- [18] J-C.G. Bünzli, *Acc. Chem. Res.* 39 **(2006)** 53.
- [19] P. Escribano, B. Julian-Lopez, J. Planelles-Arago, E. Cordoncillo, B. Viana, C. Sanchez, *J. Mater. Chem.* 18 **(2008)** 23.
- [20] K. Binnemans, L. Jongen, Ch. Görrler-Walrand, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 3 **(2001)** 4796.
- [21] K. Binnemans, C. Görrler-Walrand, *Chem. Rev.* 102 **(2002)** 2303.
- [22] N.V.S. Rao, M.K. Paul, T.R. Rao, A. Prasad, *Liquid Crystals* 9 **(2002)** 1243.
- [23] F. Lam, J. Xi Xu, K. Shing Chan, *J. Org. Chem.* 61 **(1996)** 8414.
- [24] X. Yang, R.A. Jones, W-K. Wong, *Chem. Commun.* 28 **(2008)** 3266.
- [25] X. Yang, R.A. Jones, *J. Am. Chem. Soc.* 127 **(2005)** 7686.

- 
- [26] P-F. Yan, P-H. Lin, F. Habib, T. Aharen, M. Murugesu, Z-P. Deng, G-M. Li, W-B. Sun, *Inorg. Chem.* 50 **(2011)** 7059.
- [27] S. Liao, X. Yang, R.A. Jones, *Cryst. Growth Des.* 40 **(2011)** 1060.
- [28] W. Radecka-Paryzek, I. Pospieszna-Markiewicz, M. Kubicki, *Inorg. Chim. Acta.* 360 **(2007)** 488.
- [29] T. Gao, G-M. Li, P-F. Yan, J-W. Zhang, W-B. Sun, M. Suda, Y. Einaga, *Z. Anorg. Allg. Chem.* 636 **(2010)** 624.
- [30] W-B. Sun, P-F. Yan, G-M. Li, H. Xu, J-W. Zhang, *J. Solid State Chem.* 182 **(2009)** 381.
- [31] N. Henry, M. Lagrenée, F. Abraham, *Inorg. Chem. Commun.* 11 **(2008)** 1071.
- [32] C.W. Haigh, *Polyhedron* 14 **(1995)** 2871.
- [33] L-W. Yang, S. Liu, E. Wong, S.J. Rettig, C. Orvig, *Inorg. Chem.* 34 **(1995)** 2164.
- [34] R.C. Howell, K.V.N. Spence, I.A. Kahwa, D.J. Williams, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **(1998)** 2727.
- [35] W. Dou, J-N. Yao, W-S. Liu, Y-W. Wang, J-R. Zheng, D-Q. Wang, 10 *Inorg. Chem. Commun.* 10 **(2007)** 105.
- [36] T. Gao, P-F. Yan, G-M. Li, G-F. Hou, J-S. Gao, *Inorg. Chim. Acta* 361 **(2008)** 2051.
- [37] N. Reddig, M.U. Triller, D. Pursche, A. Rompel, B. Krebs, *Z. Anorg. Allg. Chem.* 628 **(2002)** 2458.
- [38] C.G. Pitt, Y. Bao, J. Thompson, M.C. Wani, H. Rosenkrantz, J. Metterville, *J. Med. Chem.* 29 **(1986)** 1231.
- [39] V. Patroniak, A.R. Stefankiewicz, J-M. Lehn, M. Kubicki, M. Hoffmann, *Eur. J. Inorg. Chem.* **(2006)** 144.
- [40] J-P. Costes, F. Dahan, G. Novitchi, V. Arion, S. Shova, J. Lipkowski, *Eur. J. Inorg. Chem.* **(2004)** 1530.
- [41] R. Koner, G-H. Lee, Y. Wang, H-H. Wei, S. Mohanta, *Eur. J. Inorg. Chem.* **(2005)** 1500.
- [42] C. Piguet, G. Bernardinelli, J-C. Bünzli, S. Petoud, G. Hopfgartner, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **(1995)** 2575.
- [43] C. Piguet, J-C. Bünzli, G. Bernardinelli, G. Hopfgartner, S. Petoud, O. Schaad, *J. Am. Chem. Soc.* 118 **(1996)** 6681.
- [44] J.H. Serrano; *Metallomesogens, Synthesis, Properties and Applications*, VCH, Weinheim, Germany **(1996)**.
-

- [45] D.W. Bruce; In: *Inorganic Materials*, 2nd Ed., chapter 8, Wiley, Chichester **(1996)** 429.
- [46] Q. Li, T. Li, J. Wu, *J. Phys. Chem. B* 105 **(2001)** 12293.
- [47] K. Binnemans, K. Lodewyckx, T. Cardinaels, T.N. Parac-Vogt, C. Bourgogne, D. Guillon, B. Donnio, *Eur. J. Inorg. Chem.* **(2006)** 150.
- [48] K. Binnemans, K. Lodewyckx, B. Donnio, D. Guillon, *Eur. J. Inorg. Chem.* **(2005)** 1506.
- [49] R.C. Palenik, K.A. Abboud, S.P. Summers, L.L. Reitfort, G.J. Palenik, *Inorg. Chim. Acta* 359 **(2006)** 4645.
- [50] V. Alexander, *Chem. Rev.* 95 **(1995)** 273.
- [51] B.E. Robertson, *Inorg. Chem.* 16 **(1977)** 2735.
- [52] W. Radecka-Paryzek, M. Kubicki, E. Luks, *Struct. Chem.* 21 **(2010)** 299.
- [53] M. Carcelli, S. Ianelli, P. Pelagatti, G. Pelizzi, D. Rogolino, C. Solinas, M. Tegoni, *Inorg. Chim. Acta* 358 **(2005)** 903.
- [54] M. Carcelli, G. Corazzari, S. Ianelli, G. Pelizzi, C. Solinas, *Inorg. Chim. Acta* 353 **(2003)** 310.
- [55] D.G. Paschalidis, I.A. Tossidis, M. Gdaniec, *Polyhedron* 19 **(2000)** 2629.
- [56] D.G. Paschalidis, I.A. Tossidis, M. Gdaniec, *Struct. Chem.* 15 **(2004)** 605.
- [57] E. Kimura, S. Aoki, T. Koike, M. Shiro, *J. Am. Chem. Soc.* 119 **(1997)** 3068.
- [58] K. Niihara, A. Metzger, E.V. Anslyn, *J. Am. Chem. Soc.* 120 **(1998)** 8533.
- [59] P.B. Beer, *Chem. Commun.* **(1996)** 689.
- [60] B.H.M. Snellink-Ruel, M.G.M. Antonisse, J.F.L. Engbersen, P. Timmerman, D.N. Reinhoudt, *Eur. J. Org. Chem.* **(2000)** 165.
- [61] E. Fan, S.A. Van Arman, S. Kincaid, A.D. Hamilton, *J. Am. Chem. Soc.* 115 **(1993)** 369.
- [62] Y. Morzherin, D.M. Rudkevich, W. Verboom, D.N. Reinhoudt, *J. Org. Chem.* 58 **(1993)** 7602.
- [63] Z. Lin, S. Ou, C. Duan, B. Zhang, Z. Bai, *Chem. Commun.* **(2006)** 624.
- [64] J. Li, Y. Wang, H. Lin, H. Lin, *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* 63 **(2009)** 281.
- [65] J. Kurreck, *Eur. J. Biochem.* 270 **(2003)** 1628.
- [66] R.H. Symons, *Ann. Rev. Biochem.* 61 **(1992)** 641.
- [67] G.J. Hannon, *Nature* 418 **(2002)** 244.
- [68] M. Komiyama, N. Takeda, H. Shigekawa, *Chem. Commun.* **(1999)** 1443.

- 
- [69] J.J. Butzow, G.L. Eichhorn, *Biopolymers* 3 **(1965)** 95.
- [70] G.L. Eichhorn, E. Tarien, J.J. Butzow, *Biochemistry* 10 **(1971)** 2014.
- [71] S.J. Franklin, *Bioinorg. Chem.* 5 **(2001)** 201.
- [72] L. Yi, Y. Takanori, *Ann. Neurol.* 56 **(2004)** 124.
- [73] J-C. Bünzli, C. Piguet, *Chem. Rev.* 102 **(2002)** 1897.
- [74] M.J. Young, J. Chin, *J. Am. Chem. Soc.* 117 **(1995)** 10577.
- [75] N.H. Williams, B. Takasaki, M. Wall, A.J. Chin, *Acc. Chem. Res.* 32 **(1999)** 485.
- [76] A.A. Veverov, R.S. Brown, *Inorg. Chem.* 40 **(2001)** 3588.
- [77] P.E. Jurek, A.E. Martell, *Chem. Commun.* **(1999)**.
- [78] P.E. Jurek, A.M. Jurek, A.E. Martell, *Inorg. Chem.* 39 **(2000)** 1016.
- [79] R. Kierzek, Structural consideration concerning cleavage of RNA , w: *Artificial nucleases*, red. M.A. Zenkova, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 13 **(2004)** 33.
- [80] M.K. Stern, J.K. Bashkin, E.D. Sall, *J. Am. Chem. Soc.* 112 **(1990)** 5357.
- [81] A.S. Modak, J.K. Gard, M.C. Merriman, K.A. Winkler, J.K. Bashkin, M.K. Stern, *J. Am. Chem. Soc.* 113 **(1991)** 283.
- [82] J.R. Morrow, L.A. Buttrey, V.M. Shelton, K.A. Berback, *J. Am. Chem. Soc.* 114 **(1992)** 1903.
- [83] N. Hayashi, N. Takeda, T. Shiiba, M. Yashiro, K. Watanabe, M. Komiyama, *Inorg. Chem.* 32 **(1993)** 5899.
- [84] W. Radecka-Paryzek, V. Patroniak, J. Lisowski, *Coord. Chem. Rev.* 249 **(2005)** 2156.
- [85] A. Kimberly, K.A. Kołasa, J.R. Morrow, A.P. Sharam, *Inorg. Chem.* 32 **(1993)** 3983.
- [86] D.A. Usher, *Nature New Biol.* 235 **(1972)** 207.
- [87] D.A. Usher, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 62 **(1969)** 661.
- [88] J. Ciesiolka, T. Marciniak, W.J. Krzyzosiak, *Eur. J. Biochem.* 182 **(1989)** 445.
- [89] T. Marciniak, J. Ciesiolka, J. Wrzesinski, W.J. Krzyzosiak, *FEBS. Lett.* 243 **(1989)** 293.
- [90] A. Kuzuya, K. Machida, T. Sasayama, Y. Shi, R. Mizoguchi, M. Komiyama, *J. Alloys Comp.* 408-412 **(2006)** 396.
- [91] K. Matsumura, M. Endo, M. Komiyama, *Chem. Commun.* **(1994)** 2019.
- [92] T. Nüttymäki, H. Lönnberg, *Org. Biomol. Chem.* 4 **(2006)** 15-25.
- [93] D. Magda, R.A. Miller, J.L. Sessler, B.L. Iverson, *J. Am. Chem. Soc.* 116 **(1994)** 7439.
-

- [94] D. Magda, S. Crofts, A. Lin, D. Miles, M. Wright, J.L. Sessler, *J. Am. Chem. Soc.* 119 **(1997)** 2293.
- [95] D. Magda, M. Wright, S. Crofts, A. Lin, J.L. Sessler, *J. Am. Chem. Soc.* 119 **(1997)** 6947.
- [96] J. Hall, D. Hüsken, U. Piele, H.E. Moser, R. Häner, *Chem. Biol.* 1 **(1994)** 185.
- [97] J. Hall, D. Hüsken, R. Häner, *Nucleic Acids Res.* 24 **(1996)** 3522.
- [98] R. Häner, J. Hall, A. Pfützer, D. Hüsken, *Pure Appl. Chem.* 70 **(1998)** 111.
- [99] M. Komiyama, *J. Biochem.* 118 **(1995)** 665.
- [100] U. Kaukinen, L. Bielecki, S. Mikkola, R.W. Adamiak, H. Lönnberg, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **(2001)** 1024.
- [101] K. B. Gudasi, S. A. Patil, R.S. Vadavi, R. V. Shenoy, M. Nethaji, S. W. A. Bligh, *Inorg. Chim. Acta* 359 **(2006)** 3229.
- [102] W. Radecka-Paryzek, *Can. J. Chem.* 87 **(2009)** 1.
- [103] W. Radecka-Paryzek, V. Patroniak-Krzyminiewska, H. Litkowska, *Polyhedron* 17 **(1998)** 1477.
- [104] C.K. Modi, S.H. Patel, M.N. Patel, *J. Therm. Anal. Cal.* 87 **(2007)** 441.
- [105] S.H. Patel, P.B. Pansuriya, M.R. Chhasatia, H.M. Parekh, M.N. Patel, *J. Therm. Anal. Cal.* 91 **(2008)** 413.
- [106] Q.Y. Chen, Ch.J. Feng, Q.H. Luo, Ch.Y. Duan, X.S. Yu, D.J. Liu, *Eur. J. Inorg. Chem.* **(2001)** 1063.
- [107] R. Karmakara, Ch. R. Choudhury, G. Bravic, Jean-Pascal Sutter, S. Mitra, *Polyhedron* 23 **(2004)** 949.
- [108] R.F. Wang, L.P. Jin, M.Z. Wang, S.H. Huang, X.T. Chen, *Acta Chim. Sin.* 53 **(1995)** 39.
- [109] J.F. Wang, N. Ren, F.T. Meng, J.J. Zhang, *Termochim. Acta* 512 **(2011)** 118.
- [110] C.C. Addison, D. Sutton, *Prog. Inorg. Chem.* 8 **(1967)** 195.
- [111] C.C. Addison, W.B. Simpson, *J. Chem. Soc.* **(1965)** 598.
- [112] B.O. Field, C.J. Hardy, *Quart. Rev.* 18 **(1964)** 361.
- [113] A.B.P. Lever, *Inorg. Chem.* 4 **(1965)** 1042.
- [114] D.W. James, G.M. Kimber, *Aust. J. Chem.* 22 **(1969)** 2287.
- [115] N. Logan, W.B. Sipson, *Spectrochim. Acta* 21 **(1965)** 857.

- 
- [116] K. Nakamoto, *Infrared spectra of inorganic and coordination compounds*. John Wiley, New York. 2nd ed. **(1970)**.
- [117] N.F. Curtis, Y.M. Curtis, *Inorg. Chem.* 4 **(1965)** 804.
- [118] C. Lodeiro, E. Bertolo, J.L. Capelo, R. Bastida, *Z. Anorg. Allg. Chem.* 630 **(2004)** 914.
- [119] C. Loderio, R. Bastida, E. Bertolo, A. Rodriguez, *Can. J. Chem.* 82 **(2004)** 437.
- [120] Y.T. Li, C.W. Yan, *Transition Met. Chem.* 26 **(2001)** 110.
- [121] K. Binnemans, Y.G. Galyametdinov, R. Van Deun, D.W. Bruce, S.R. Collinson, A.P. Polishchuk, I. Bikchantaev, W. Haase, A.V. Prosvirin, L. Tinchurina, I. Litvinov, A. Gubajdullin, A. Rakhmatullin, K. Uytterhoeven, L. Van Meervelt, *J. Am. Chem. Soc.* 122 **(2000)** 4335.
- [122] S. Kumari, A.K. Shingh, K.R. Kumar, B. Sridhar, T.R. Rao, *Inorg. Chim. Acta.* 362 **(2009)** 4205.
- [123] B. Keshavan, P.G. Chandrashekara, N.M. Made Gowda, *J. Mol. Struct.* 553 **(2000)** 193.
- [124] S. Ilhan, H. Temel, *J. Mol. Struct.* 891 **(2008)** 157.
- [125] N.T. Madhu, P.K. Radhakrishawan, M. Grunert, P. Weinberger, W. Linert, *Termochim. Acta* 407 **(2003)** 73.
- [126] M. Kozłowski, W. Radecka-Paryzek, *Copernican Letters* 1 **(2010)** 95.
- [127] F.B. Tamboura, P.M. Haba, M. Gaye, A.S. Sall, A.H. Barry, T. Jouini, *Polyhedron* 23 **(2004)** 1191.
- [128] A. Jagst, A. Sanchez, E.M. Vazquez-Lopez, U. Abram, *Inorg. Chem.* 44 **(2005)** 5738.
- [129] N. Nagwa, N.M. Hosny, *Transition Met. Chem.* 25 **(2000)** 1.
- [130] C. Lorenzini, C. Pelizzi, G. Pelizzi, G. Predieri, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **(1983)** 721.
- [131] A. Bonardi, C. Merlo, C. Pelizzi, G. Pelizzi, P. Tarasconi, F. Cavatorta, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **(1991)** 1063.
- [132] P.A. Kumar, *Indian J. Chem. A* 37 **(1998)** 460.
- [133] D.X. West, A.A. Nassar, *Transition Met. Chem.* 23 **(1998)** 321.
- [134] D.A. Baldwin, A.B.P. Lever, R.V. Parish, *Inorg. Chem.* 8 **(1969)** 107.
- [135] J. Linpie, D. Plancherel, J.C.G. Bünzli, *Inorg. Chim. Acta* 144 **(1988)** 269.
- [136] J. Lisowski, P. Starynowicz, *Inorg. Chem. Commun.* 6 **(2003)** 593.
-

- [137] V. Patroniak, M. Kubicki, A. Mondry, J. Lisowski, W. Radecka-Paryzek, *Dalton Trans.* **(2004)** 3295.
- [138] M. Paluch, K. Ślepokura, T. Lis, J. Lisowski, *Inorg. Chem. Commun.* 14 **(2011)** 92.
- [139] A.M. Kaczmarek, M. Kubicki, I. Pospieszna-Markiewicz, W. Radecka-Paryzek, *Inorg. Chim. Acta* 365 **(2011)** 137.
- [140] F.H. Allen, *Acta Crystallogr., Sect. B* 58 **(2002)** 380.
- [141] M. Albrecht, S. Mritschin, O. Osetska, S. Dehn, D. Enders, R. Fröhlich, T. Pape, E.F. Hahn, *Eur. J. Inorg. Chem* **(2007)** 3276.
- [142] S. Tamburini, P.A. Vigato, M. Gatos, L. Bertolo, U. Casellato, *Inorg. Chim. Acta* **(2006)** 183.
- [143] A. Bacchi, I. Ivanovic-Burmazovic, G. Pellizi, K. Andjelkovic, *Inorg. Chim. Acta* 313 **(2001)** 109.
- [144] W. Radecka-Paryzek, V. Patroniak, M. Kubicki, *Polyhedron* **(2003)** 2773.
- [145] A.B.P. Lever, E. Mantovani, B.S. Ramaswamy, *Can. J. Chem.* **(1971)** 1957.
- [146] Y. Fukuda, A. Nakao, K. Hayashi, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **(2002)** 527.
- [147] M.T. Kaczmarek, M. Kubicki, A. Mondry, R. Janicki, W. Radecka-Paryzek, *Eur. J. Inorg. Chem.* **(2010)** 2193.
- [148] M. Kozłowski, W. Radecka-Paryzek, M. Kubicki, *Acta. Cryst. E* 67 **(2011)** 559.
- [149] R. Ott, R. Krämer, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 52 **(1998)** 761.
- [150] J.A. Cowan, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 5 **(2001)** 634.
- [151] A. Sreedhara, J.A. Cowan, *J. Biol. Inorg. Chem.* 6 **(2001)** 337.
- [152] S.J. Franklin, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 5 **(2001)** 201.
- [153] L. Yi, Y. Takanori, M. Ryusuke, T. Kazunari, M. Hidehiro, *Am. Neurol. Assoc.* 56 **(2004)** 124.
- [154] E. Kierzek, R. Kierzek, W.N. Moss, S. M. Christensen, T.H. Eickbush, D.H. Turner, *Nucleic Acid Res.* 36 **(2008)** 1770.
- [155] J. Stawinski, R. Strömberg, M. Thelin, E. Westman, *Nucleosides Nucleotides* 7 **(1988)** 779.
- [156] T.B. Xia, J. SantaLucia, M.E. Burkard, R. Kierzek, S.J. Schroeder, X.Q. Jiao, C. Cox, D.H. Turner, *Biochemistry* 37 **(1998)** 14719.



- [157] R. Kierzek, M.H. Caruthers, C.E. Longfellow, D. Swinton, D.H. Turner, S.M. Freier, *Biochemistry* 25 **(1986)** 7840.
- [158] M.S. Shchepinov, I.A. Udalova, A.J. Bridgman, E.M. Southern, *Nucleic Acid Res.* 25 **(1997)** 4447.
- [159] J. Lietard, A. Meyer, J-J. Vasseur, F. Morvan, *Tetrahedron Lett.* 48 **(2007)** 8795.
- [160] W. Bannwarth, R. Knorr, *Tetrahedron Lett.* 32 **(1991)** 1157.
- [161] R. Bhushan, S. Tanwar, *J. Chromatogr. A* 120 **(2008)** 174.
- [162] M.L. Tedjamulia, P.C. Srivastava, F.F. Knapp, *J. Med. Chem.* 28 **(1985)** 1574.
- [163] P. Singh, L.L. Hingorani, *Indian J. Chem.* 29B **(1990)** 551.
- [164] M.J. Navakouski, I.I. Vashkevich, O. V. Sviridov, *Russian J. Bioorg. Chem.* 35 **(2009)** 163.
- [165] E. Sonveaux, Protecting groups in oligonucleotide synthesis, w: *Methods In Molecular Biology*, red. S. Agrawal, Humana Press Inc., Totowa, 26 **(1994)** 1.
- [166] B.N. Trawick, T.A. Osiek, J.K. Bashkin, *Bioconjugate Chem.* 12 **(2001)** 900.
- [167] A.M. Arif, J.D.J. Backer-Dirks, C.J. Gray, F.A. Hart, M.B. Hursthouse, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **(1987)** 1665.
- [168] W. Radecka-Paryzek, *Inorg. Chim. Acta* 52 **(1981)** 261.
- [169] W. Radecka-Paryzek, *Inorg. Chim. Acta* 45 **(1985)** L147.
- [170] M.T. Kaczmarek, M. Kubicki, W. Radecka-Paryzek, *Struct. Chem.* 21 **(2010)** 779,
- [171] M.T. Kaczmarek, R. Jastrz b, E. Ho lderna-K dzia, W. Radecka-Paryzek, *Inorg. Chim. Acta* 362 **(2009)** 3127.